



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Descripción de los patrones de expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* en el desarrollo de las estructuras homologas al hipocampo de pollo (*Gallus gallus*) en las fases de desarrollo embrionario HH34 a HH40

Camilo Andrés Ramírez Rojas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias
Bogotá, Colombia

2017

Descripción de los patrones de expresión de los genes Notch1 y Hes1 en el desarrollo de las estructuras homologas al hipocampo de pollo (*Gallus gallus*) en las fases de desarrollo embrionario HH34 a HH40

Camilo Andrés Ramírez Rojas

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Neurociencias

Director:

Humberto Arboleda Granados MD, MSc

Línea de Investigación:

Neurodesarrollo

Grupo de Investigación:

Grupo de Neurociencias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Maestría en Neurociencias

Bogotá, Colombia

2017

A mí familia, por su apoyo incondicional, por estar tan unidos en los momentos más difíciles. En especial a mi padre, Antonio, que esté documento sea testigo de tus enseñanzas. A mis amigos por estar allí, y en general, a todos los que me dieron ánimos y aliento cuando lo necesité.

Todo llega a su debido tiempo.

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible, sin la ayuda y colaboración de un grupo grande de personas, que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este documento. En primer lugar, quiero agradecer al profesor Humberto Arboleda, por su constante guía, sus enseñanzas y su paciencia como tutor. A Belfran Carbonell, por su asesoramiento y ayuda en la realización de los procedimientos y en la revisión del presente trabajo. A los profesores Roberto Amador, y Zulma Dueñas por su conocimiento, a la profesora Silvia Baquero, por sus consejos, su generosidad y apoyo en mi formación.

También, al *Grupo de Neurociencias* y al *Grupo de Neurodesarrollo*, de la Universidad Nacional, por haberme recibido y hacerme parte de estos. A *Grupo de Crecimiento y Desarrollo Craneofacial* de la *Maestría en Odontología*, por permitirme compartir con ellos y los conocimientos adquiridos de su experiencia para la elaboración de esta tesis.

A la Maestría en Neurociencias, la Facultad de Medicina y la División de Investigación de Bogotá – DIB por financiar esta investigación. A mis compañeros y amigos de laboratorio, por los buenos momentos mientras realizábamos los distintos procedimientos. Y en general, a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron a que este trabajo de investigación se haya llevado a cabo.

Resumen

La vía de señalización Notch, está involucrada en distintos procesos durante el desarrollo embrionario de los organismos. Aunque algunas investigaciones han estudiado la conformación del hipocampo en determinadas fases del desarrollo embrionario, hasta el momento no ha sido reportado la participación de genes de la vía Notch.

El objetivo de esta investigación es determinar los patrones de expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* y realizar el análisis cualitativo de estos patrones durante el desarrollo de las estructuras hipocampales en el modelo de pollo. Por medio de la técnica de hibridación *in situ* previamente usada en otros estudios, y usada sobre cortes coronales de 6 y 9 μm , se estudiaron los patrones de expresión de los genes mencionados en los estadios de desarrollo de Hamburger y Hamilton (HH) HH34, HH36, HH38 y HH40, en los cuales se conforma las estructuras hipocampales en el pollo.

De esta manera, se encontró expresión de los genes, aunque de manera distinta para cada uno. Se encontró la expresión del gen *Notch1* en las regiones homologas al hipocampo en aves, en los estadios HH34 y HH36. Sin embargo, no se encontró expresión en los estadios HH38 y HH40 en ninguna región cerebral. En el caso del gen *Hes1*, hay expresión del gen en todos los estadios estudiados (HH34 a HH40), y también se observó en las regiones ventriculares, donde las neuronas tuvieron una formación de unidades radiales. Estos hallazgos sugieren que la vía Notch puede ser importante durante el desarrollo del hipocampo en el pollo, al encontrarse expresión de los dos genes seleccionados. Al observar que la expresión de los genes no es igual, al expresarse en algunas regiones diferentes y en estadios distintos de desarrollo, no se puede descartar la participación de otros genes de la misma vía.

Palabras clave: Notch, Notch1, Hes1, vía de señalización Notch, hipocampo, neurodesarrollo, embrión de pollo

Abstract

The Notch signaling pathway is involved in different processes in the embryonic development of organisms. Although some researchs have studied the conformation of the hippocampus at certain stages of embryonic development, the participation of Notch pathway genes has not been reported so far.

The objective of this research is to determine the expression patterns of the *Notch1* and *Hes1* genes and perform the qualitative analysis of these patterns during the development of hippocampal structures in the chicken model. Through *in situ* hybridization technique previously used in other studies and used on coronal sections of 6 and 9 μm , the expression patterns of the genes mentioned were studied in the development stages of Hamburger and Hamilton (HH) HH34, HH36, HH38 and HH40, in which the hippocampal structures are formed in the chicken.

In this manner, we found expression of the genes, but in a different way for each one. Expression of the *Notch1* gene was found in the hippocampal homologous regions in birds at the HH34 and HH36 stages. However, the expression in the HH38 and HH40 stages was not found in any brain region. In the case of the *Hes1* gene, there is expression of the gene at all stages studied (HH34 to HH40), and was also observed in ventricular regions, where neurons had a formation of radial units. These findings suggest that the indentation pathway may be important during hippocampal development in the chicken, in coagulating the coexpression of the two selected genes. Observing that the expression of genes is not the same, expressed in some different regions and at different stages of development, the participation of other genes of the same pathway can not be ruled out.

Keywords: Notch, Notch1, Hes1, Notch signaling pathway, hippocampus, neurodevelopment, chick embryo

Contenido

	Pág.
1. Marco teórico y conceptual.....	3
1.1 Desarrollo embrionario	
1.2 Migración y diferenciación neuronal	
1.3 Vía de señalización Notch	
1.4 Hipocampo mamífero y aviar	
2. Problema, pregunta, justificación.	23
3. Objetivo.....	27
4. Materiales y métodos.....	29
5. Resultados y Discusión.....	33
6. Conclusiones y recomendaciones	63

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Modelo de unidades radiales.....	6
Figura 1-2: Comparación de los modelos clásicos de desarrollo cortical.	7
Figura 1-3: Dominio de Notch.....	11
Figura 1-4: Lista de los receptores y ligandos de la vía Notch.	12
Figura 1-5: Esquema representacional de la vía Notch.....	13
Figura 1-6: Domino intracelular de Notch.....	14
Figura 1-7: Distintos tipos de diferenciación del destino celular en los que está actuando la vía Notch.	15
Figura 1-8: Esquema de la señalización de la vía Notch mediando tanto la inhibición lateral como la inducción.	16
Figura 1-9: Sección coronal del hipocampo mamífero.	17
Figura 1-10: Representación esquemática del hipocampo adulto mamífero y aviar, representando las diferentes sub-regiones.	19
Figura 1-11: Migración de las neuronas hipocampales en pollo en el neurodesarrollo a partir del estadio HH34.	20
Figura 1-12: Genes con sus patrones de expresión hipocampal en el embrión de pollo.	21
Figura 5-1: Especificidad de las sondas utilizadas para evaluar la expresión de los genes <i>Notch1</i> y <i>Hes1</i> en embriones de pollo.	34
Figura 5-2: Controles positivos de los patrones de expresión de <i>Notch1</i> y <i>Hes1</i> en prominencias faciales durante el estadio HH23 y HH21 respectivamente.....	34
Figura 5-3: Resultados para el gen <i>Notch1</i> en estadio HH34.	36
Figura 5-4: Resultados para el gen <i>Notch1</i> en estadio HH36.	37
Figura 5-5: Resultados para el gen <i>Notch1</i> en estadio HH38.	37
Figura 5-6: Resultados para el gen <i>Notch1</i> en estadio HH40.	38
Figura 5-7: Resumen de resultados para gen <i>Notch1</i>	39
Figura 5-8: Resultados para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH34 41	41
Figura 5-9: Resultados para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH36.	42
Figura 5-10: Resultados para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH38.	43
Figura 5-11: Resultados para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH40.	44
Figura 5-12: Resumen de resultados para el gen <i>Hes1</i>	44
Figura 5-13: Distribución temporal y espacial de los patrones de expresión de los genes <i>Notch1</i> y <i>Hes1</i> en las regiones que conforman el hipocampo de pollo.	47
Figura 5-14: Corte para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH34 en vista general a 25x.....	52

Gráfica 5-15:	Comparación de los valores de luminiscencia en regiones de expresión – no expresión en micras, para la primera selección en corte HH34 del gen <i>Hes1</i>	54
Gráfica 5-16:	Comparación de los valores de luminiscencia en regiones de expresión – no expresión en micras, para la segunda selección en corte HH34 del gen <i>Hes1</i>	54
Gráfica 5-17:	Comparación de los valores de luminiscencia en regiones de expresión – no expresión en micras, para la tercera selección en corte HH34 del gen <i>Hes1</i>	56
Figura 5-18:	Corte para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH38 sobre corte de 8um de la zona VM a 200x.	57
Figura 5-19:	Corte para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH38 sobre corte de 8um de la zona VL a 200x.	58
Figura 5-20:	Corte para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH38 sobre corte de 8um de la zona VM a 200x.	58
Figura 5-21:	Corte para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH38 sobre corte de 8um de la zona VL a 200x.	59
Figura 5-22:	Corte para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH40 sobre corte de 8um de la zona VM a 200x.	59
Figura 5-23:	Corte para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH40 sobre corte de 8um de la zona VM a 200x.	60
Figura 5-24:	Corte para el gen <i>Hes1</i> en estadio HH40 sobre corte de 8um de la zona VM a 200x.	60

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Componentes de la vía Notch en diferentes especies.	9
Tabla 5-1: Distribución temporal y espacial de los patrones de expresión de los genes <i>Notch1</i> y <i>Hes1</i> en las regiones que conforman el hipocampo de pollo.	47
Tabla 5-2: Relación del valor bruto de luminiscencia de la sección 1.	55
Tabla 6-1: Descripción de los estadios HH.....	65

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
Ald	Arcopallio y subdivisiones, par dorsal
CP	Plato cortical
DEPC	Dietilpirocarbonato (Dietil dicarbonato)
DL	Región dorso lateral
DM	Región dorso medial
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
HCl	Ácido clorhídrico
HH	Hamburguer y Hamilton
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
LGN	Núcleo geniculado lateral
LMD	Lámina medular dorsal
KCl	Cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NICD	Dominio intracelular de Notch
PA	Paleostriatum Augmentatum
PBS	Buffer fosfato salino
PBT	PBS + Tween 20 0.1%
PFA	Paraformaldehído
PBS/DEPC	Solución buffer / dietilpirocarbonato
pH	Potencial hidrógeno
RG	Guía radial glial
RBPj	proteína recombinante de unión supresora de calvicie
SNC	Sistema nervioso central
SP	Subplato
SVZ	Zona subventricular
TSM	Tracto septomesencefálico
V	Zona ventral en forma de V
VL	Ventrículo lateral
VP	Núcleo ventral posterior de tálamo dorsal
VZ	Zona ventricular

Introducción

La vía de señalización Notch, como mecanismo de comunicación célula-célula, juega un papel importante en el desarrollo embrionario, participando de diversos procesos como lo son diferenciación, proliferación, decisión del destino celular, y apoptosis (Haines e Irvine, 2003; Fiúza y Arias, 2007; Kopan e Ilagan, 2009; Januschke et al, 2014; Schwanbeck, 2015). Algunos estudios han sugerido la participación de esta vía en el desarrollo de extremidades y órganos (Cornell & Eisen, 2002; Wang et al, 2004; Bray, 2006; Abello et al, 2007; Pierfelice et al, 2011), pero sin encontrarse literatura sobre su participación específica en estructuras que dan origen a las regiones homologas al hipocampo, responsables de la memoria espacial en pollos.

En estudios similares previos de esta línea en el laboratorio (Bayona, 2012; Carbonell, 2012; Gutiérrez, 2012), se ha podido establecer los patrones de expresión de genes de esta vía en el desarrollo craneofacial y arcos branquiales entre estadios HH14 a HH23, usando la técnica de hibridación *in situ* (ISH), dando resultados positivos en cuanto la posible participación de esta vía en el desarrollo de estas estructuras en el embrión de pollo. Estudios previos han señalado que el desarrollo de las regiones que componen del hipocampo en el pollo, así como la migración celular desde las áreas neurogénicas se produce entre los estadios HH34 y HH40 (Atoji y Wild, 2006), estadios donde se ha identificado, por medio de ISH, la expresión de genes como *Prox1*, *NeuroD*, *Lef1*, *Daxin*, entre otros, que pueden estar involucrados en la proliferación, migración y/o diferenciación neuronal (Gupta et al., 2012). Dado que no hay información específica sobre genes de la vía Notch, y conociendo que esta vía está involucrada en procesos de diferenciación en circuitos neuronales (Sloan y Barres, 2014), se establece esta vía como objeto de interés para el presente estudio, donde se tratará de determinar su posible participación en el desarrollo de las presentes estructuras en los estadios correspondientes, dadas la importancia que esta estructura cerebral tiene para el organismo.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar los patrones de expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* durante el desarrollo de las estructuras hipocampales en el modelo de pollo, previamente usado en el laboratorio, en los estadios de desarrollo de Hamburger y Hamilton (HH) HH34 a HH40, por medio de la técnica de ISH. Para tal fin, se construyeron sondas específicas para cada gen marcadas con digoxigenina, de forma que se pudiera identificar la expresión del gen. Los resultados obtenidos, muestran que hay expresión de ambos genes, pero no comparten las mismas regiones en los estadios estudiados. En el caso del gen *Notch1*, se encontró la expresión de este gen en las regiones homologas al hipocampo en aves, en los estadios HH34 y HH36. De igual manera, en estos mismos estadios se encontró dicho gen en otras regiones del cerebro. Sin embargo, no se encontró expresión en los estadios HH38 y HH40 en ninguna región cerebral. En el caso del gen *Hes1*, hay expresión del gen en todos los estadios estudiados (HH34 a HH40), y también se observó en las regiones ventriculares, donde las neuronas tuvieron una formación de unidades radiales.

En conjunto la evaluación sistemática de los patrones de expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* en los estadios evaluados sugieren que la vía Notch puede ser importante durante el desarrollo del hipocampo en el pollo, al encontrarse expresión de los dos genes seleccionados. Al observar que la expresión no es igual, se sugieren futuros estudios con otros genes de la vía, para poder determinar de mejor manera la posible interacción entre los mismos. De igual manera, se sugiere en futuros trabajos, determinar los patrones de expresión de estos genes en estadios más tempranos del desarrollo (HH30 y HH32)

1.Marco teórico y conceptual

1.1 Desarrollo embrionario

Todos los vertebrados poseen un proceso de desarrollo que inicia con la segmentación del cuerpo, que da origen a los distintos órganos internos y las estructuras que los protegen (Resende et al, 2014). Este proceso se puede observar de manera similar, en la conformación del Sistema Nervioso Central (SNC), cuya formación se inicia en etapas tempranas del desarrollo embrionario.

Así, el desarrollo del encéfalo en general comienza desde la formación de la placa neural y la marcación de los destinos celulares en el ectodermo en el estadio HH4, los cuales llevarán a la conformación del tubo neural y de la notocorda en el nodo de Hensen, ocurriendo una diferenciación de tejidos desde las áreas anterior a posterior, conllevando la desaparición de la línea primitiva, guía de la orientación del desarrollo en estas primeras fases, en un proceso conocido como *regresión* (Bellaris y Osmond, 2005; Resende et al, 2014).

Desde el ectodermo en HH3 empieza la formación de la placa neural, desde una pequeña pieza del ectodermo, junto con el mesodermo subyacente, los cuales son tomados de las regiones anteriores de la placa neural y darán lugar al tubo neural entre los estadios HH3 y HH4. Inicialmente, no hay un borde morfológico definido entre las células de la placa neural y el ectodermo adyacente, mientras que el epitelio adyacente cambia gradualmente en la zona de transición, necesaria para que se formen los pliegues neurales (Bellaris y Osmond, 2005). La placa neural es inducida por el nodo de Hensen, no solo por regiones específicas de este, sino además con ciertos tipos de células. La placa neural se pliega en un tubo neural y ese se diferencia en todo su largo en regiones especializadas del cerebro y la espina cordal. Los nodos jóvenes (en HH4) pueden inducir la formación del Sistema Nervioso Central (SNC) tanto anterior como posterior, mientras que los más antiguos solo pueden inducir SNC posterior. Después de que la placa neural se ha formado, los

movimientos morfogénicos de regresión dirigen aun angostamiento y posterior extensión de la región del tronco y su crecimiento en la región cerebral. A su vez, se presentan cambios celulares, donde las células epidermales se vuelven más planas y las células neuronales más profundas. La notocorda se une al piso de la placa neural y actúa como un ancla sobre la cual la placa neural se puede plegar y doblar para formar el tubo. La fusión de los pliegues neurales comienza alrededor del HH8 a nivel de las áreas mediales (que constituirán el mesencéfalo) seguida por la fusión a través de todo el cerebro y las regiones anteriores del tronco. El punto final de la fusión en la formación cerebral en este punto es en el neuroporo anterior, el cual desaparece cerca del HH12. El tubo neural se cierra progresivamente hacia abajo en el tronco hasta el HH13, y ahora el ectodermo no encerrado en el tubo neural se convierte en epidermis (Bellaris y Osmond, 2005; Resende et al, 2014)

1.2 Migración y diferenciación neuronal

Un punto importante dentro del neurodesarrollo es la migración celular, proceso que se considera biológicamente necesario. Las células nerviosas inmaduras poseen una gran capacidad de moverse a la que será su posición definitiva y establecer conexiones sinápticas permanentes, proceso denominado como migración, que describe el desplazamiento de una neurona desde la zona proliferativa, hasta su destino final en lo que será el cerebro maduro (Rakic, 1990), el cual permite la comunicación entre neuronas que se forman temprano y tarde en etapas críticas de desarrollo, antes de que hagan sus conexiones sinápticas.

La migración de las neuronas es un fenómeno celular que se presenta de distintas maneras. En el SNC de los vertebrados la migración neuronal difiere en varios aspectos de los movimientos de las células de la cresta neural en el sistema nervioso periférico, siendo una diferencia significativa que las células de la cresta neural en el sistema nervioso periférico se someten a la división mitótica durante la migración, mientras que en el SNC la migración se inicia únicamente después de completada la última división celular (Rakic, 1990)

Esta migración celular puede distinguirse del movimiento de crecimiento que se observa durante la extensión de axones y dendritas, que suele ocurrir durante estadios de

desarrollo posterior. La migración involucra una desviación de células postmitóticas de otros elementos en la zona proliferativa y activa el desplazamiento de neuronas no diferenciadas en relación con el medio celular que las rodea (Rakic, 1990). Este movimiento de neuronas avanza a lo largo de vías específicas, se produce de acuerdo con un programa temporal bien definido, y se detiene en localizaciones definidas con precisión. Teniendo en cuenta la orientación y direccionalidad del movimiento celular, la migración puede ser clasificada en dos ejes (Rakic, 1990; 1995):

1. Radial: del ventrículo a la superficie de la piamadre. La organización en columnas básicas de varias estructuras en el SNC (principalmente mamífero) refleja esta forma de movimiento celular y es visible, particularmente, en las primeras fases del desarrollo.
2. Tangencial: Corre forma predominantemente paralela a la superficie cerebral. Este modelo de migración permite el traspaso de neuronas de un compartimiento cerebral a otro, y ocurre más frecuentemente en estadios de desarrollo tardíos.

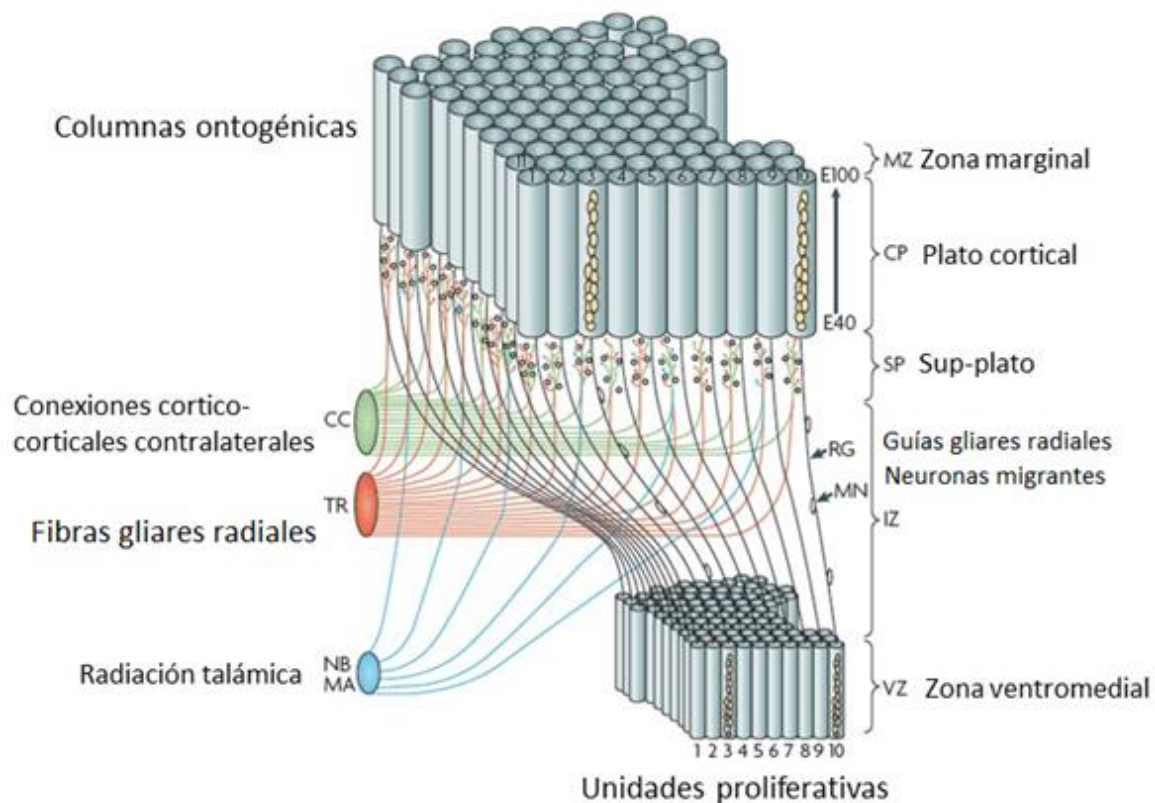
Evidencia obtenida desde análisis *in vivo* e *in vitro* han mostrado que la interacción entre neuronas que realizan migración y la superficie de células vecinas juega un papel importante en seleccionar el substrato migratorio, y en la orientación, desplazamiento y detenimiento de las neuronas en su ubicación final (Rakic, 1990)

A partir del análisis del comportamiento proliferativo y migratorio de las neuronas se establece el modelo de unidad radial del desarrollo cortical. En este modelo (Rakic, 1988) la zona proliferativa en la superficie del ventrículo cerebral es considerada como un mosaico bidimensional o *protomapa* que consiste en *unidades proliferativas* las cuales contienen varios clones de células en división. Cada una de las unidades proliferativas produce células post mitóticas que se mueven a la corteza a través de un *has glial* común (Rakic, 1988; 2009). Dicho mecanismo preserva tan cerca como es posible la relación de vecindad entre células que comparten un mismo sitio de origen (Rakic, 1990). Después de entrar en la corteza, las neuronas migrantes pasan por medio de las neuronas que arribaron antes formando columnas ontogenéticas (Figura 1-1) (Rakic, 1988; 1990; 2009). Así, el protomapa de unidades radiales puede ayudar a establecer huellas genéticas de un

mapa citoarquitectónico de la corteza cerebral específico de una especie. De esta manera, según el protomapa las diferentes regiones cerebrales se preespecifican antes de la migración de las células post mitóticas (Lopez-Mascaraque & De Castro, 2004; Rakic, 1988) donde la llegada de los axones sirve para modificar y refinar dicho protomapa.

Figura 1-1: Modelo de unidades radiales.

La relación entre una pequeña área de la zona proliferativa ventricular (VZ) y su área correspondiente en el plato cortical (CP) en el cerebro en desarrollo. Las neuronas producidas entre E40 y E100 por una unidad proliferativa dada migran de manera sucesiva a través de las mismas guías radiales gliales (RG) las cuales se desplazan y apilan en orden inverso en la misma columna ontogénica. Cada neurona migrante (MN) atraviesa primero la zona intermedia Modificado de Rakic (2009) con información de (1989) y (1995).

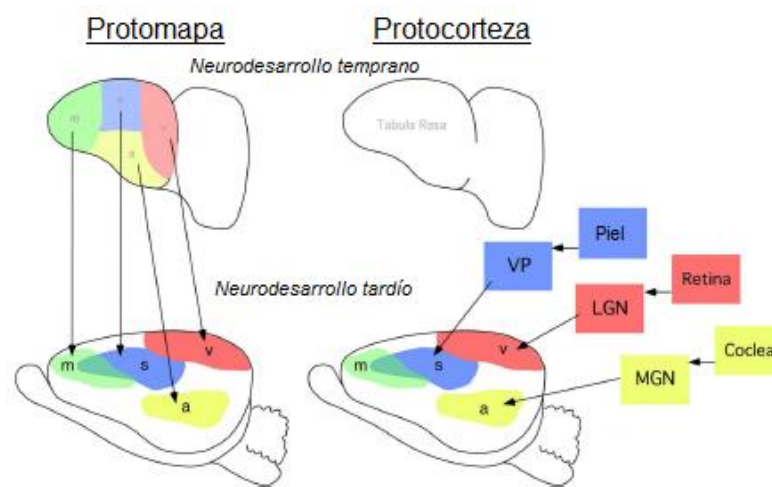


En contraposición a este modelo, se ha postulado el modelo de la protocorteza (O'Leary, 1989; 2002), según la cual distintas áreas corticales provienen de una corteza indiferenciada que se especializa con resultado de diferentes aferencias talámicas (Huffman, 2012; O'Leary, 2002)

De esta manera, el modelo del protomapa se basa en mecanismo intrínsecos, como la expresión de genes que determinan la pre-especificación, mientras que el modelo de la protocorteza se basa en mecanismos extrínsecos, principalmente las aferencias talámicas provenientes de órganos sensoriales. Algunas investigaciones consideran más plausible el modelo del protomapa sobre el de la protocorteza (Lopez-Mascaraque & De Castro, 2004), mientras que otras consideran que los dos mecanismos, tanto intrínseco como extrínseco, interactúan para formar el mapa cortical específico de la especie (Figura 1-2) (Huffman, 2012)

Figura 1-2: Comparación de los modelos clásicos de desarrollo cortical.

Esquemas representacionales de una vista una corteza en formación, y un estadio posterior después que los axones tálamo corticales han comenzado a entrar en el plato cortical cuando áreas sensoriales y motoras se están formando (desarrollo temprano y tardío). En estos, de forma simplificada se comparan los modelos del protomapa y la protocorteza. En el primer modelo (izquierda), la corteza temprana posee un patrón predeterminado por gradientes moleculares a través de la corteza en desarrollo. La distinción de las distintas áreas surge como determinantes moleculares, y esos factores corticales intrínsecos imparten información sobre la posición del área. El segundo modelo (derecha) la neocorteza temprana es considerada como una pizarra en blanco o *tabula rasa*, en la que las diferencias en las áreas surgen basadas en aferencias sensoriales originados en el tálamo dorsal. Tanto las células corticales como las regiones están “asignados” a territorios sensoriales y motores basados en dichas aferencias. Mientras que el modelo del protomapa sigue un proceso independiente de actividad, el modelo de la protocorteza es dependiente de actividad. Modificado de Huffman (2009)



1.3 Vía de señalización Notch

Esta vía es un mecanismo de comunicación intercelular que recibe su nombre debido a que su componente principal es el receptor Notch, y permite una comunicación de contacto dependiente entre célula y célula (Kopan y Ilagan, 2009), conociendo su participación en procesos como la regulación de células progenitoras neuronales, patrones de formación, y por estar involucrada en la diferenciación y destino celular en vertebrados (Schweisguth, 2004; Pierfelice T, Alberi L y Gaiano N, 2011, Sloan y Barres; 2014), ejerciendo un papel regulador en el desarrollo en metazoos, y por tanto está altamente conservada evolutivamente (Fortini, 2009). Aunque es más conocido por su medición en la inhibición lateral (proceso que se explicará más adelante), también regula otros procesos de diferenciación.

La vía Notch juega un papel importante desde los primeros estadios de desarrollo de un organismo, debido a la continua necesidad de regular la producción de diferentes tipos celulares y al mismo tiempo mantener la capacidad pluripotencial de las células madre y/o progenitoras, manteniendo así la especificación de destino celular como grupos de células no diferenciadas que se segregan en distintos linajes. Todo esto, además, sin que Notch sea el factor determinante de un destino celular en específico sino uno permisivo, es decir, permitiendo la selección de uno entre varios posibles destinos dependiendo del contexto, teniendo como resultado procesos tan variados como inhibición, promoción de diferenciación, proliferación o apoptosis de la célula (Sander, Krysinska & Powell, 2006). Este mecanismo de comunicación célula-célula, regula así el crecimiento celular, proliferación, supervivencia, destino, diferenciación y morfogénesis permitiendo la formación de distintos tipos celulares en un tejido (Schweisguth, 2004; Sander et al., 2006; Bone et al, 2014; Lopes-Moreira, 2014), teniendo un papel destacado en la embriogénesis, pero también siendo reportado en estados adultos del desarrollo (Schweisguth, 2004; Sander et al., 2006) por lo que en los últimos años ha surgido un interés por el estudio de esta vía, no solo durante la embriogénesis sino también durante la adultez (Schweisguth, 2004; Brai et al, 2015; Kong et al, 2015), relacionado con memoria (Lasky y Wu, 2005; Marathe & Alberti, 2015; Mendes-da-Silva, 2015; Ryan, Guévremont, Luxmanan, Abraham & Williams, 2015; Zhang et al, 2015b) y neurodegeneración (Lasky y Wu, 2005; Yuan & Hassam, 2014; Zhu, Feng, Liu & Wu; 2015; Zhuang, Wei, Lin & Zhou, 2015).

La postura tradicional es que Notch, basado en diversos estudios sobre esta vía, inhibe la neurogénesis para mantener las características de las células madre y/o progenitoras, y promover gliogénesis, influenciando así el destino neuronal, eventos que suceden en distintas especies tales como pez cebra, pollos y ratones (Lasky y Wu, 2005; Pierfelice et al., 2011; Zhang et al, 2015a).

La vía de señalización Notch es regulada por interacciones célula-célula, ya que involucra la activación del receptor Notch (los cuales pueden ser cuatro en mamíferos, *Notch1-4*) en la membrana celular por medio de ligandos, que son proteínas expresadas por células vecinas, de la familia DSL (*Delta*, *Serrate*, *Lag*), (Figura 1-4) que incluye *Delta* (*Dll1*, 3, 4) y *Serrate*(*Ser*) /*Jagged* (*Jag1*, 2) (Tabla 1-1) (Lasky y Wu, 2005; Fortini, 2009; Pierfelice, Alberi & Gaiano, 2011).

Los miembros de la vía Notch, tanto los receptores Notch como las familias de ligandos son, en su mayoría, proteínas transmembranales (TM) (Figura 1-3, 1-4). Los receptores de Notch poseen un dominio extracelular compuesto principalmente por 29 a 36 repeticiones en tándem de proteínas de factor de crecimiento epidérmico (EGF)-like (Wharton et al., 1985; Yochem and Greenwald, 1989, Lasky y Wu, 2005) de cerca de 300 kDa en la superficie de la célula receptora, los cuales incluyen dominios de unión de ligando extracelulares; y un dominio intracelular de Notch (NICD). Estos receptores son activados por un grupo de ligandos de superficie de la familia DSL de la célula efectora, los cuales también son proteínas TM.

Tabla 1-1: Componentes de la vía Notch en diferentes especies.

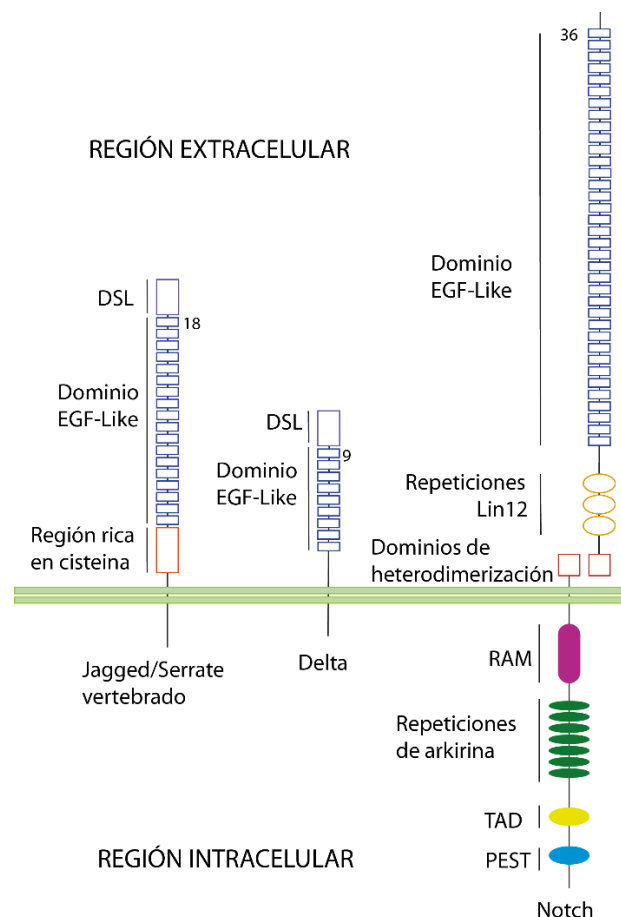
Resumen de los distintos componentes que están presentes en la vía Notch, en distintas especies (*Drosophila*, *C.elegans* y vertebrados en general). Los componentes que están presentes en la especie *Gallus gallus* se encuentran en la columna de vertebrados, pero no todos los componentes señalados en dicha columna están presentes en esa especie. Tabla modificada de Bray (2006), Fiúza y Arias (2007) y Kopan y Ilagan (2009).

Tipo de componente	Tipo	Drosophila melanogaster	Vertebrados y mamíferos	Caenorhabditis elegans
Receptor		Notch	Notch1-4	LIN-12, GLP-1
Ligando	DLS/DOS	Delta, Serrate	Delta1-4/A-D, Serrate, Jagged1-2	APX-1, LAG-2
	DSL solo		Delta3-4	AGR-2, DLS1-7
	Coligandos DOS		DLK-1-2/egfl9	DOS1-3, OSM7 y 11
	No canónicos		DNER, MAGP1-2, F3/Contactina1, NB-3/Contactinina6	
Efactor Nuclear	Proteína de unión DNA CSL	Su(H)	CBF1/RBPkI	LAG-1
	Co activador de la transcripción	Mastermind	Mastermind1-3	LAG-3
	Co represor de la transcripción	Hairless, SMRTR	SMRT	
Proteólisis del receptor	Furin convertasa		PC5/6, Furin	
	Metaloproteasa	Kuzbaniana, TACE	ADAM10/Kuzbaniana, ADAM17/TACE	SUP-17/Kuzbaniana, ADM4/TACE
	Complejo γ -secretasa	Presenilina, nicastrina, APH1, PEN2	Presenilina1-2, nicastrina, APH1, PEN2	SEL-12/presenilina, APH-2/nicastrina, APH-1, PEN-2
Modificadores de glicosiltransferasa	Glicosiltransferasa	Fringe	Lunatic Fringe, Radical Fringe, Manic Fringe	
	O-fucosiltransferasa	OFUT-1	POFUT-1	OFUT-1
	O-glucosiltransferasa	RUMI		
Degeneración del NICD	Ubiquitin ligasa F-Box	Archipelago	Fbw-7/SEL-10	SEL-10

Esta interacción inicia una cascada de acciones bioquímicas que llevan al NICD, una vez clivado por la cascada, a que ese dominio sea libre de trasladarse al núcleo y funcionar como un factor de transcripción, es decir, a desplazarse de la membrana al núcleo alterando la actividad de las redes de expresión génica por medio de una regulación en la transcripción (Lasky y Wu, 2005; Sander et al., 2006; Kegeyama et al, 2009), proceso que será descrito más adelante.

Figura 1-3: Dominio de Notch.

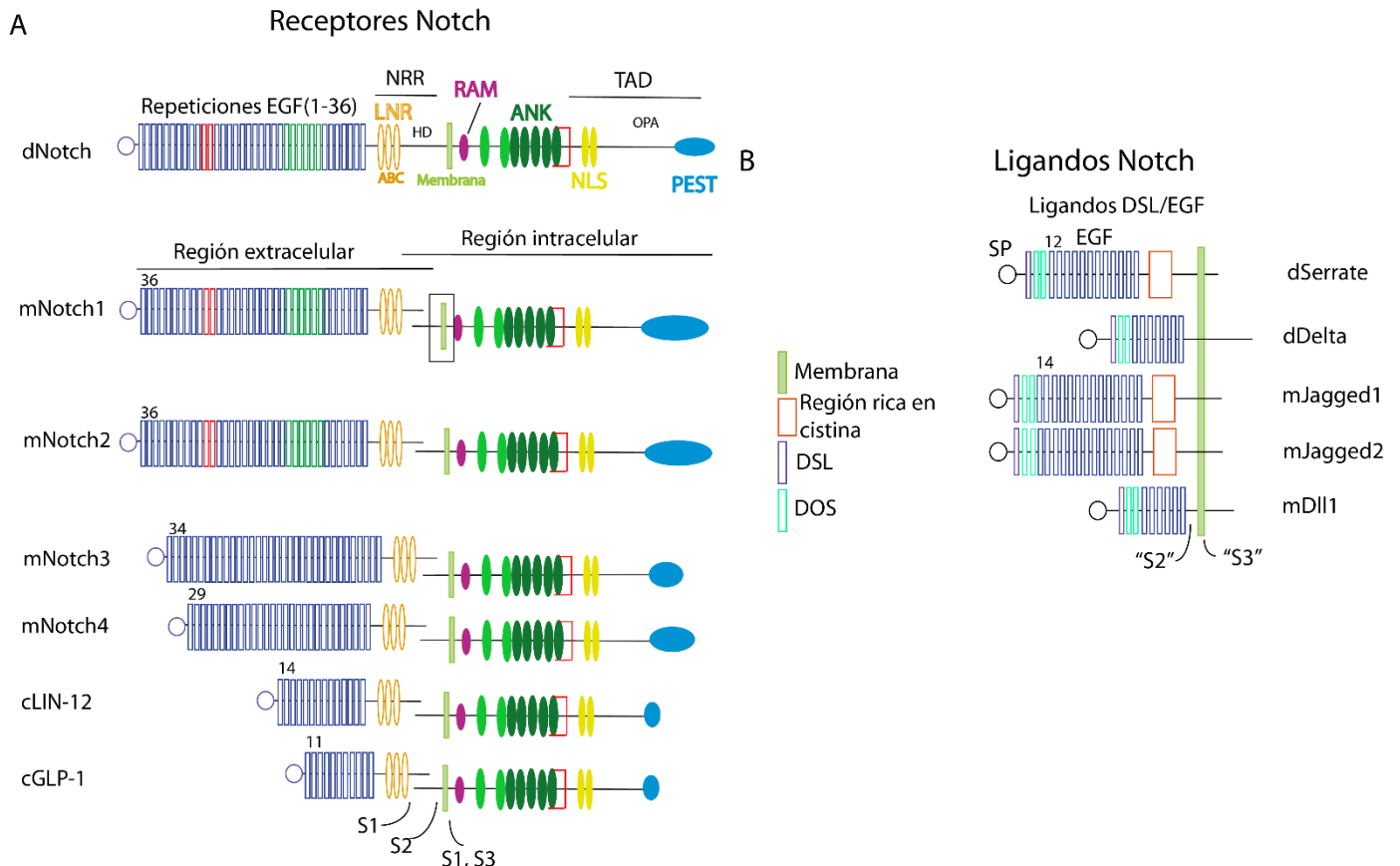
El dominio extracelular de Notch consiste principalmente en repeticiones de EGF-like (en azul), las cuales oscilan entre 36 y 29 según la especie (vertebrados e insectos) e incluso sólo 10 (en *C.elegans*). Este dominio incluye tres repeticiones Lin12/Notch (LNRs; óvalos naranja claro). Las repeticiones de EGF 11 y 12 (morado) son necesarios y suficientes para ligar Dll y Ser. Adaptada de Schweisguth (2004) con información de Fleming (1998) y Fiúza & Arias (2007)



De esta forma, la activación del receptor por parte de los ligandos resulta en el clivaje proteolítico de la porción intracelular del receptor, el cual es transportado al núcleo donde induce la transcripción específica de genes (Sander et al., 2006). La vía “canónica” ha sido llamada así para diferenciarla de otros modos de señalización que se consideran atípicos (Fortini, 2009; Marathe y Albin, 2015) en los que no ocurre la unión de NICD con factores de transcripción (como *RBPjk*) para inducir transcripción de objetivos corriente abajo (Marathe y Albin, 2015). La interacción receptor-ligando involucra una unión directa de un dominio N-terminal del ligando con las repeticiones EGF-like 11-12 del receptor de Notch (Rebay et al., 1991) (Figura 1-3).

Figura 1-4: Lista de los receptores y ligandos de la vía Notch.

A) Receptores Notch. Son proteínas transmembranales multidominio, Notch 1-4 que tienen conformaciones similares, en el dominio extracelular se diferencia por el número de EGF-like; en el dominio intracelular las repeticiones de ankirina, RAM y PEST. B) Ligandos Notch. Ligandos de la vía Notch. Los dominios ricos en cisteína, característicos de los ligandos Serrate/Jagged. Los ligandos Delta, como Delta 1 (DII1), difieren en su dominio extracelular por el número de dominios de EGF – like. Imagen modificada de Kopan & Ilagan (2009)



La señalización inductiva puede ocurrir cuando tanto receptores Notch como ligandos están presentes en distintas células. Durante esta señalización, las células que están expresando el ligando activan la vía Notch en la célula receptora, influenciando así su destino de desarrollo (Lasky y Wu, 2005; Kageyama et al, 2009). Cuando el ligando y el receptor son expresados en la misma célula, existe la posibilidad de una interacción *cis* entre ellos y, esto puede conducir a la diferenciación de un linaje.

La estimulación del receptor involucra endocitosis mediada por dinamina en las células efectora y receptora de la señal, con la ubiquitinación de los ligandos y receptores utilizados para conducir la internalización (Pierfelice et al., 2011). Después de la activación del receptor, NICD es clivada inicialmente en el sitio 2 (S2) por una proteinasa ADAM like, deshaciéndose así del dominio extracelular, y seguidamente en el sitio 3 y 4 (S3 y S4, cercanos a la membrana citosólica) por las proteasas Presenilina (PSEN1/2) en el complejo γ -secretasa, llevando a la liberación de NICD la cual es translocada al núcleo por asociación con CBF1 y proteínas MastermindLike (Maml) para activar la transcripción de los genes objetivo (Kageyama et al, 2009; Pierfelice et al., 2011).

Figura 1-5: Esquema representacional de la vía Notch.

Cuando el ligando y el receptor se unen, ADAM y γ -secretasa clivan el receptor de Notch en las regiones S2 y S3/S4. En ese momento el dominio intracelular de Notch (NICD) es liberado, y se transloca al núcleo donde funciona como factor de transcripción. Adaptado de Fiúza & Arias (2007) y Kopan e Ilagan (2009) con información de Fortini (2009).

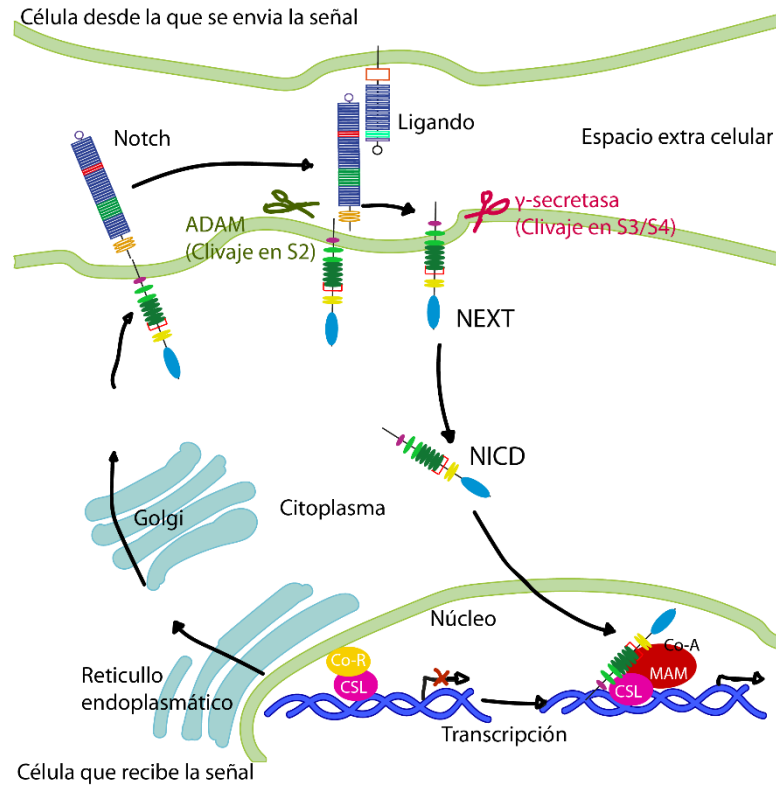
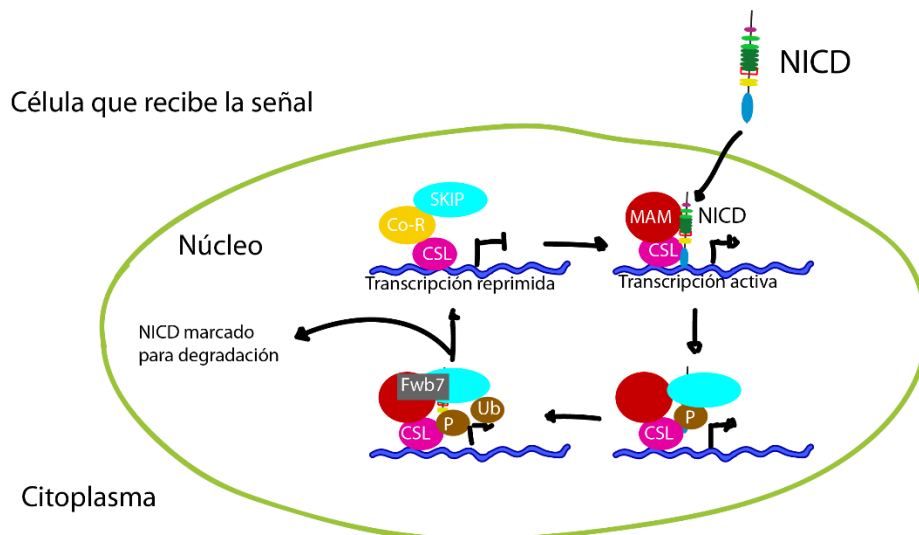


Figura 1-6: Dominio intracelular de Notch.

El dominio intracelular de Notch (NICD) interactúa en el núcleo con la proteína de unión al DNA CSL (CBF1, Su(H) y LAG-1). El co-activador Mastermind (Man) y otros factores de transcripción son reclutados por el complejo CSL, formando un complejo trimétrico mientras que el co-represor (Co-r) es liberado (Lasky y Wu, 2005; Bray, 2006). Posterior a la actividad de Notch, este es fosforilado, ubiquitinado y finalmente degradado para regular su actividad. Imagen tomada de Fiúza & Arias (2007).



Las funciones de la vía durante los diversos procesos fisiológicos y del desarrollo, pueden ser subdivididos en tres tipos en los que la vía Notch funciona como regulador (Figura 1-7): por inhibición lateral, por señalización inductiva y por división asimétrica o decisión de linaje (Bray, 2006), siendo mejor conocida la participación de Notch en la inhibición lateral, proceso por el cual unos bucles de retroalimentación positiva y negativa los cuales regulan a la alta o a la baja la señalización de la vía, previniendo que las células vecinas adopten el mismo destino al mismo tiempo. En un principio, en el proceso de inhibición lateral, se encuentran poblaciones equipotenciales de células precursoras, las cuales expresan tanto receptores Notch como ligandos en su superficie, en donde la expresión de Notch se reduce en algunas células, mientras que en otras es regulada a la alta la expresión de ligandos, estimulando la señalización de Notch en células vecinas previamente no alteradas, en la cuales se reduce la expresión del ligando, resultando en distintas poblaciones celulares (receptor bajo/ ligando alto y receptor alto/ligando bajo), adoptando así diferentes destinos y convirtiéndose en células de distintos tipos (por ejemplo, neurona y glía en vertebrados) (Figura 1-8).

Figura 1-7: Distintos tipos de diferenciación del destino celular en los que está actuando la vía Notch.

(A) En la inhibición lateral, un grupo de células precursoras (morado claro) envían una señal por medio de la vía para inhibir la posibilidad de las demás de tomar un destino celular distinto. En seguida, el proceso es amplificado en varios ciclos y, una célula de cada grupo obtiene la mayor inhibición de Notch (morado oscuro). La activación de Notch en las otras conlleva a un destino celular distinto (en gris). (B) En una división asimétrica de las células, en cada división celular, Notch es activado en una célula hija (línea continua) pero no en las demás (línea punteada), lo que conlleva a la adopción de distintos tipos celulares (mostrados de distintos colores). (C) La señalización inductiva ocurre cuando un grupo de células (en gris claro) envían una señal (flechas en naranja) para diferenciar a un grupo de células vecinas (azules) para inducir un nuevo destino entre los dos grupos celulares (rojo). Modificado de Haines e Irvine (2003).

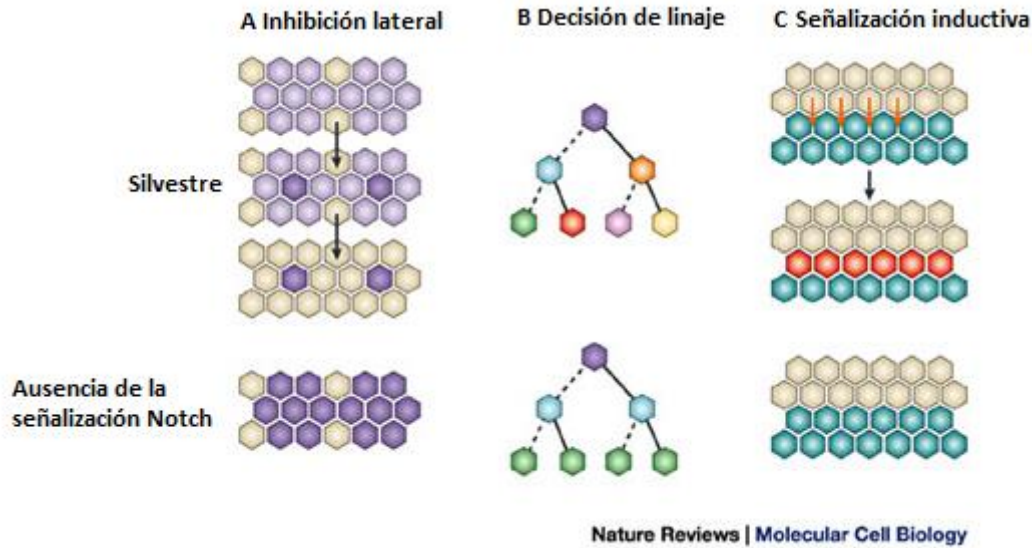
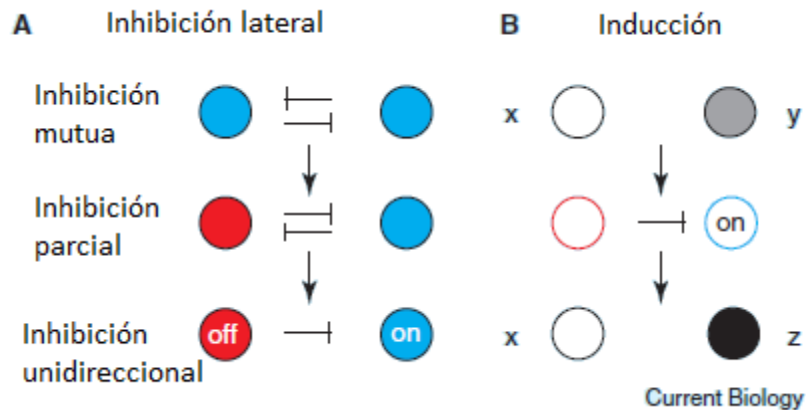


Figura 1-8: Esquema de la señalización de la vía Notch mediando tanto la inhibición lateral como la inducción.

(A) Notch mediando la señal recíproca inhibitoria entre dos células que tienen un potencial de desarrollo similar. (B) Notch mediando la señalización unilateral entre dos células (X y Y) con distintos destinos. La activación en X hace que Y se diferencie en Z. Modificado de Schweisguth (2004).



En el sistema nervioso embrionario, los genes diana mejor caracterizados de Notch son *Hes* (principalmente *Hes1* y *Hes5*) y genes relacionados con *Hey*. Estos genes codifican proteínas inhibitorias de hélice-bucle-hélice (*bHLH*), las cuales reprimen la función de las proteínas proneurales *bHLH* así como *Ascl1* en el prosencéfalo y Neurogeninas

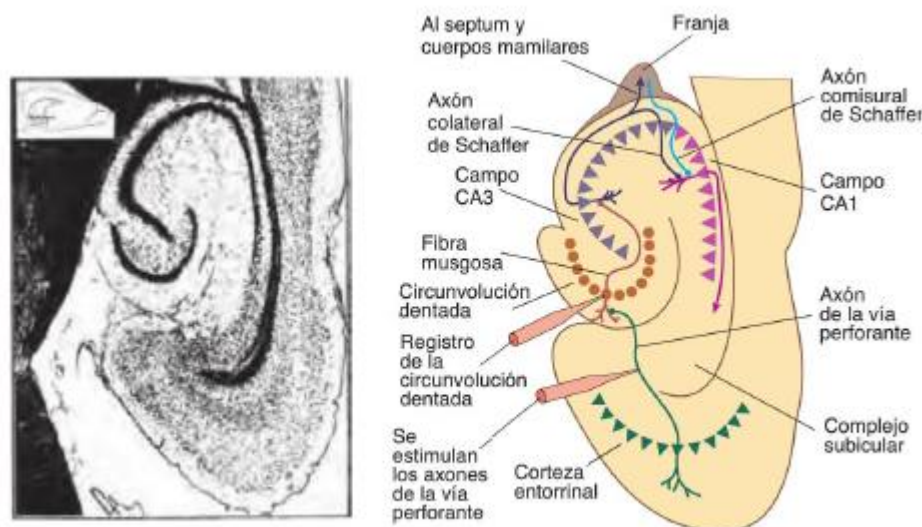
(*Neurog1/2*) en la neocorteza, las cuales promueven la diferenciación celular y, por tanto, las células que contienen Notch son inhibidas para convertirse en neuronas.

1.4 Hipocampo mamífero y aviar

El hipocampo se ha asociado a procesos de memoria y orientación espacial vitales para la supervivencia en mamíferos y aves, que ayudan a la supervivencia del organismo (Sweatt, 2003; Kesner y Martinez, 2007; Carlson, 2014). Se ha descrito así, que el hipocampo en los mamíferos está involucrado en la codificación de la memoria espacial y temporal, atribuibles al “dónde” y “cuándo” de un evento (lo que se asocia a la memoria episódica en humanos), encontrándose que el hipocampo está relacionado en la secuencia temporal de eventos (Bannerman et al., 2004) pero que distintas regiones se especializan de mejor manera en el procesamiento de distinta información, ya que, se ha reportado que la región dorsal del hipocampo está involucrada activamente en el aprendizaje espacial, e incluso, la región ventral de esta estructura participa en el control comportamental en ciertas situaciones de ansiedad (Bannerman et al., 2004; Kesner y Martinez, 2007; Chaudhury et al, 2008) (Figura 1-9)

Figura 1-9: Sección coronal del hipocampo mamífero.

(A) Vista anatómica del hipocampo. (B) Representación esquemática de las estructuras y vías. Pirámides en verde: corteza entorrinal; gris: CA3; violeta: CA1. Círculos color ocre: circunvolución dentada. Neurona en verde: vía perforante; ocre: fibra musgosa; negro: colateral de Schaffer; azul: comisural de Schaffer. Modificado de Carlson (2014)



Viendo la importancia que cumple esta estructura cerebral, se ha encontrado que en todos los vertebrados se encuentra una región homologa en funciones a la del hipocampo mamífero, incluyendo peces y aves (Sweatt, 2003). Así, se han descrito semejanzas en cuanto a función, mediante estudios de memoria y aprendizaje espacial (reportados por Tommasi et al., 2003 y Gupta et al., 2012), y a su vez se han hallado similitudes tanto en el desarrollo, conectividad y neurotransmisores (Källén, 1962; Casiniet al., 1986; Erichsen et al., 1991; Krebs et al., 1991; citados por Tommasi et al., 2003; Mody et al, 2001). El rol de la formación de la memoria y su relación con el hipocampo de pollo ha sido estudiado principalmente en palomas (*Columba livia*), y también en pollos (*Gallus gallus*) en distintas clases de estudios (como imprinting: Horn, 1998; aprendizaje de evitación pasivo de un ensayo: Rose, 2000; estadios en formación de memoria: Andrew, 1997; también en Andrew, 1991; Rogers, 1993, 1995; citados por Tommasi et al).

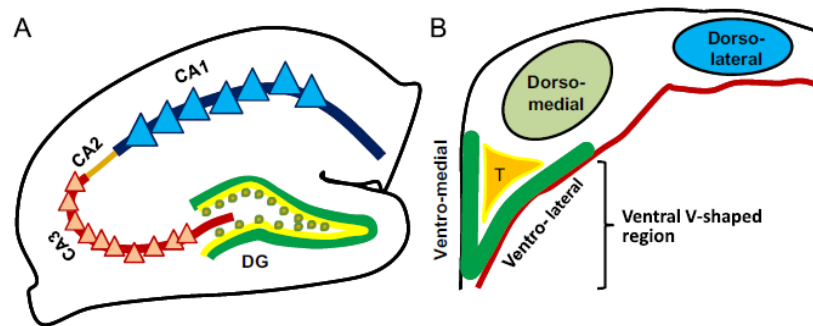
Sin embargo, y a pensar de las semejanzas que se pueden encontrar respecto a la función, los hipocampos mamífero y aviar son diferentes en términos de su morfología y cito-arquitectura. Mientras el hipocampo mamífero tiene subdivisiones distintas como el giro dentado y la región del cuerno de Ammón, el hipocampo aviar está compuesto por unos arreglos cercanos y homogéneos de grupos de neuronas los cuales progresivamente se van fusionando con la región parahipocampal (APH) sin una delimitación precisa (Gupta et al., 2012). Basados en análisis histológicos reportados en la literatura, se ha descrito la división del hipocampo de paloma en las siguientes divisiones: región dorso medial (DM), región dorso lateral (DL), región triangular (T), y los brazos ventro medial (VM) y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V, las cuales se pueden apreciar en la figura 1-10.

Aunque a través de varios modelos han sido utilizados para establecer la homología estructural entre mamíferos y aves, aún no es clara la precisa equivalencia entre regiones. Usando *tract tracing*, Kahn et al. (2003) han propuesto a la región DM del hipocampo aviar, como homologa del giro dentado mamífero, y la región ventral con forma de V como homologa del cuerno de Amón, teniendo en cuenta que este estudio sólo considera la conexión intrínseca entre las subregiones del hipocampo aviar, sin tener en cuenta las proyecciones aferentes o eferentes de las neuronas hipocampales (Gupta et al., 2012). Basados en su trabajo, Atoji y Wild (2004) han propuesto que las subdivisiones de DM

muestran propiedades tanto del cuerno de Ammón el subículo de los mamíferos. Además, las conexiones en el área ventral en forma de V proyectan hacia la región DM en el hipocampo aviar. Así, este circuito neuronal se asemeja a la vía de la fibra musgosa en el giro dentado mamífero, por tanto, esta región en V ha sido propuesta por estos autores, como la homóloga al giro dentado.

Figura 1-10: Representación esquemática del hipocampo adulto mamífero y aviar, representando las diferentes sub-regiones.

(A) Sección coronal del hipocampo mamífero. (B) Sección coronal a través del prosencéfalo aviar. Modificado por Gupta et al. (2012) de Atoji y Wild (2006)

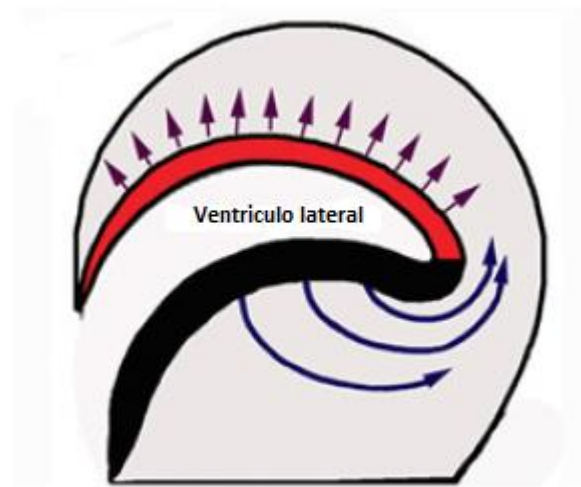


Las zonas neurogénicas, como las antes descritas, de las que provienen las neuronas del hipocampo mamífero durante su desarrollo han sido descritas por los estudios de Altman y Bayer (1974, 1990b), pero, no ha habido estudios que demuestren el origen exacto de la vía de migración seguido por las neuronas hipocampales aviares. Al parecer, es posible que la zona neurogénica que permite el crecimiento de las neuronas hipocampales de pollo está limitada al revestimiento medial del ventrículo lateral adyacente al primordio del hipocampo (zona neurogénica hipocampal, ZNH). Si esta región es la fuente primaria de las neuronas hipocampales, entonces estas deben experimentar una migración radial de forma que puedan alcanzar su posición final en el hipocampo (Figura 1-11). Por otro lado, las neuronas hipocampales pueden surgir del revestimiento del ventrículo lateral que es diametralmente opuesto de la ZNH (zona neurogénica lateral, ZNL) Adicionalmente se ha demostrado en los estudios de Cobos et al. (2001) que la mayoría de las interneuronas en el Palio se originan en el Subpalio y migran tangencialmente hacia su destino final en el

hipocampo. Sin embargo, el origen y las vías migratorias del resto de neuronas hipocampales permanecen sin conocerse (Chaudhury, Nag & Wadhwa, 2008; Gupta et al., 2012)

Figura 1-11: Migración de las neuronas hipocampales en pollo en el neurodesarrollo a partir del estadio HH34.

Representación esquemática de una sección coronal del prosencéfalo embrionario de pollo en la región hipocampal. En rojo, zona neurogénica hipocampal, ZNH. En negro, zona neurogénica lateral, ZNL. Flechas rojas, migración radial. Flechas negras, migración tangencial. Modificado de Gupta et al (2012)

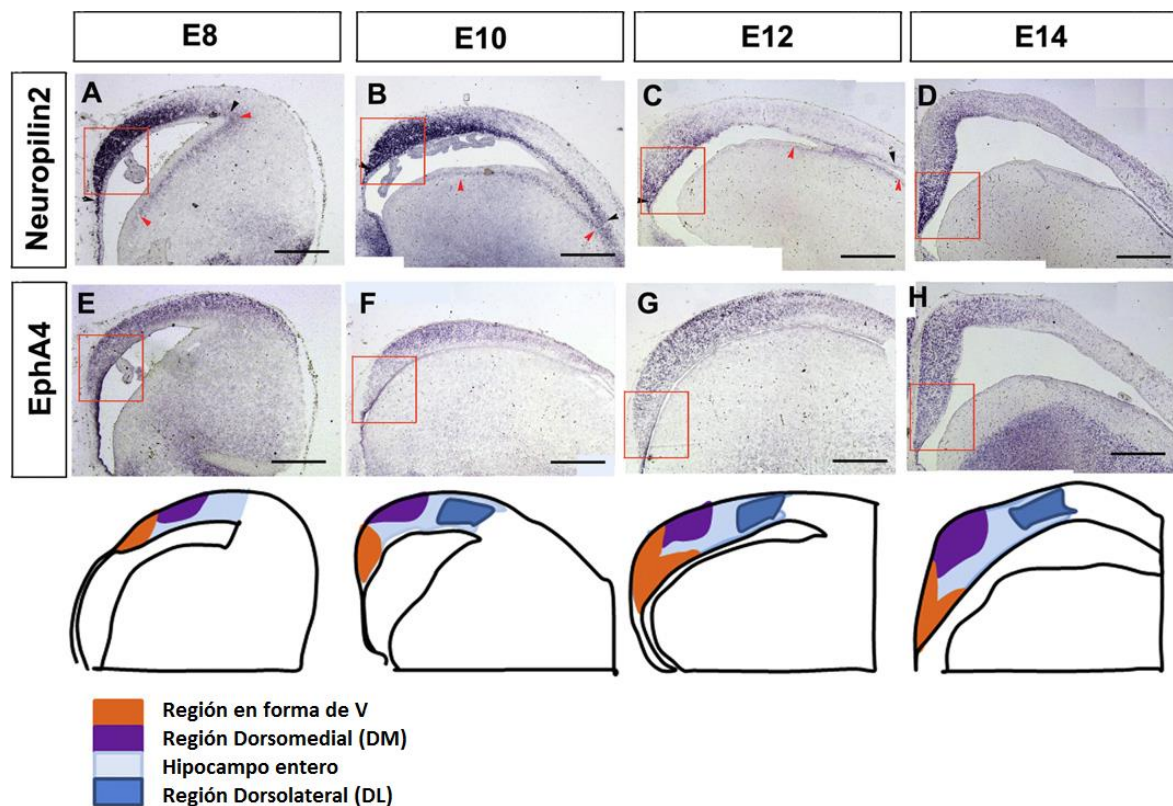


Al compararse el hipocampo mamífero y aviar, una región neurogénica adyacente al primordio del cuerno de Ammón genera las neuronas de esta estructura. Estas neuronas después de nacer experimentan una migración radial para ocupar su posición final en el cuerno de Ammón del hipocampo maduro. Por otro lado, el giro dentado es formado en una zona neurogénica distinta, ventral a la región neurogénica Ammonica y migran tangencialmente para ocupar su posición final en el giro dentado maduro. Sin embargo, hasta la fecha aún no se ha logrado establecer la identidad de la zona neurogénica que da lugar a la mayor parte de las neuronas del hipocampo de pollo (Gupta et al.) Del estudio de Cobos et al. (2001) se podría predecir que tal vez, las interneuronas hipocampales en el pollo se originan en el subpalio y migran tangencialmente para ocupar sus posiciones finales en el hipocampo. Sin embargo, no se han llevado estudios que determinen específicamente el origen y la vía de migración de las neuronas en el hipocampo de pollo.

Se ha descrito que el hipocampo y el área parahipocampal en el pollo juegan un papel importante en el aprendizaje espacial, el almacenamiento de comida, regreso al hogar y en el aprendizaje de tareas de evitación pasiva. Como en los mamíferos, el hipocampo aviar aparentemente está involucrado en el procesamiento y almacenamiento de información espacial. La conformación de esta área se da de neuronas que migran radialmente desde los ventrículos laterales del cerebro de pollo, conformándose esta estructura entre los días embrionarios HH34 a HH40 (bajo los criterios de desarrollo del embrión de pollo descritos por Hamburger y Hamilton).

Figura 1-12: Genes con sus patrones de expresión hipocampal en el embrión de pollo.

(Superior) Crio secciones de cortes coronales de la región hipocampal en el embrión de pollo, donde se llevaron a cabo hibridación *in situ* de RNA de los genes de interés (Neuropilina2 y EphA4) en los días embrionarios E8 (A, E), E10 (B, F), E12 (C, G) y E14 (D, H) respectivamente. (Inferior) Representación esquemática el hipocampo de pollo en los estadios E8 a E14, con las sub-regiones del hipocampo marcadas por colores. Modificado de Gupta et al. (2012)



2. Problema, pregunta, justificación.

Si bien varios modelos animales han sido empleados con el objetivo de comprender los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el desarrollo de las estructuras hipocampales, las diferencias entre especies hacen que este desarrollo sea distinto entre mamíferos y otras especies como las aves, entre otras. La utilización del modelo de pollo (*Gallus gallus*) responde a que es un modelo económico, de fácil obtención, presenta un tiempo de formación relativamente corto, es de fácil manejo y la formación de las estructuras hipocampales es de fácil seguimiento, comparado con modelos mamíferos (utilización de ratones) (Bellairs y Osmond, 2005), además de ser un modelo previamente utilizado en el laboratorio, siendo así ya conocido su manejo. Así mismo, este modelo ha sido reportado en la literatura en su utilización para estudiar varias vías de señalización durante el desarrollo de estructuras craneofaciales y encefálicas. Dado que no hay información detallada sobre genes de la vía Notch en el neurodesarrollo del hipocampo de pollo, y conociendo que esta vía está involucrada en procesos de diferenciación, se establece esta vía como objeto de interés para el presente estudio, donde se busca determinar su posible participación en el desarrollo hipocampal así como en las citadas estructuras que conforman esta estructura cerebral en los estadios correspondientes, dada la importancia que el hipocampo tiene para el organismo. De esta manera, surge la pregunta de investigación, ¿Se asocian los patrones de expresión de componentes de la vía Notch (*Notch1* y *Hes1*) con la regionalización del hipocampo?

Esta investigación se formula como un estudio de tipo descriptivo, en el que se busca identificar los patrones de expresión de *Notch1*, y *Hes1* durante el desarrollo hipocampal temprano, siguiendo la descripción sobre la migración neuronal en las estructuras homologas al hipocampo, utilizando el modelo de embrión de pollo (*Gallus gallus*).

La vía Notch está implicada en los procesos de diferenciación celular en distintas especies. Se ha encontrado la expresión de genes relacionados con esta vía en etapas tempranas del desarrollo embrionario de pollo (HH21), así como su expresión post embrionaria. Dada

la importancia que tiene esta vía, y conociéndose que se expresan ligandos y receptores de esta antes y después del desarrollo de las estructuras hipocampales, es interesante que haya un vacío en la literatura acerca del posible papel que esté jugando en el desarrollo concreto de estas estructuras. En estudios previos de esta línea en el laboratorio (Bayona 2012; Carbonell, 2012; Gutiérrez, 2014), se ha podido establecer los patrones de expresión de genes de esta vía en el desarrollo craneofacial y arcos branquiales entre estadios HH14 a HH23, usando la técnica de ISH, dando resultados positivos en cuanto la posible participación de esta vía en el desarrollo de estas estructuras en el embrión de pollo. Estudios reportados en la literatura (Bellairs y Osmond, 2005; Gupta et al, 2012), han señalado que el desarrollo de las regiones que componen del hipocampo en el pollo (región dorso medial (DM), región dorso lateral (DL), región triangular (T), y los brazos ventro medial (VM) y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V), así como la migración celular desde las áreas neurogénicas se produce entre los estadios HH34 y HH40, estadios donde se ha identificado, por medio de ISH, la expresión de genes como *Prox1*, *NeuroD*, *Lef1*, *Daxin*, entre otros, que pueden estar involucrados en la proliferación, migración y/o diferenciación neuronal.

Adicionalmente, estudios previos han tratado de establecer su posible relación con enfermedades neurodegenerativas, dada la interacción de presinilinas 1 y 2 (PS1 y PS2) y la proteína precursora de β -amiloide (APP) con mecanismos de esta vía (Costa et al, 2003; Wang et al, 2004; Yoon y Gaiano, 2005). De igual manera, se han reportado estudios recientes en los que la supresión de genes de la vía puede afectar procesos de memoria por su relación con el hipocampo (Chaudhury et al, 2008; Kageyama et al, 2010; Marathe y Albin, 2015, Zhang et al, 2015). Aunque se ha estudiado estos procesos en animales adultos (Kageyama et al, 2009; Oya et al, 2009), no hay información del papel de la vía Notch en el desarrollo del hipocampo, por tanto, el presente estudio se puede constituir en un referente para futuras investigaciones en esta línea que puedan estudiar las citadas interacciones.

De acuerdo con todo lo anterior, se plantea la hipótesis de estudio que hay expresión de los dos genes seleccionados de la vía Notch (gen del receptor *Notch1* y gen diana *Hes1*) en la regionalización del hipocampo de pollo, en los estadios HH34 a HH40. Por tanto, se buscó determinar los patrones de expresión del gen del receptor *Notch1* y del gen diana

Hes1 durante el desarrollo de las áreas homologas al hipocampo (estadios HH34 a HH40) en un modelo de pollo.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar los patrones de expresión del gen del receptor *Notch1* y del gen diana *Hes1* durante el desarrollo de las áreas homologas al hipocampo (estadios HH34 a HH40) en un modelo de pollo.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar la expresión del gen que codifica para el receptor *Notch1* durante el desarrollo del área dorsal y lateral del hipocampo en un modelo de pollo en los estadios HH34, HH36, HH38 y HH40
2. Identificar por medio de cortes, las zonas de interés del hipocampo de pollo: región dorso medial (DM), región dorso lateral (DL), región triangular (T), los brazos ventro medial (VM) y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V.
3. Analizar la posible expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* en la región dorso medial (DM) y dorso lateral (DL) y región triangular (T)
4. Analizar la posible expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* en la región ventro medial (VM) y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V.

4. Materiales y métodos.

4.1 Embriones de pollo

Los huevos fertilizados de gallina (*Gallus gallus*) se obtuvieron de una granja ubicada en Pacho (Cundinamarca), productora de huevos para el consumo humano. Una vez entregados por la granja, se transportaron hasta el laboratorio en condiciones de temperatura y humedad controladas. Los huevos fueron incubados entre 37.2°C y 37.8°C, con una condición de humedad del 66% al interior de la incubadora, la cual se encontraba en el Laboratorio de Neurociencias en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional (IGUN). Los huevos permanecieron allí la cantidad de tiempo establecido en la literatura según los criterios de Hamburger y Hamilton (1992) (Anexo A) más 24 horas adicionales, para obtener los estadios de interés HH34, HH36, HH38 y HH40 (9, 11, 13, 15 días respectivamente) (Bellairs y Osmond, 2005). Se llevaron a cabo 3 réplicas por estadio, para cada gen (n=3) en cada estadio.

4.2 Fijación y embebido de embriones

Una vez obtenidos los estadios adecuados, los embriones se extrajeron en solución Buffer fosfato salino (PBS) para confirmar la clasificación y retirar tanto las membranas como todo aquello que pudiera interferir en la posterior fase de corte. Posteriormente, se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% toda la noche (14-16 horas). Finalizada la fijación, los embriones se deshidrataron en un lavado de PBT (PBS + Tween 20 0.1%) y series de etanol en PBT al 50%, 60%, 70%, 80% 95% y 100%. El último lavado en etanol al 100% se repitió, luego se realizó dos lavados en xilol al 100% por 10 minutos, seguido de un lavado en xilol-parafina (1:1) por 45 minutos, y dos lavados en parafina. Después del último lavado, los embriones permanecieron toda la noche en parafina limpia (al menos 24 horas), y al día siguiente eran embebidos en cubos de parafina utilizando moldes de aluminio.

4.3 Síntesis de ribosondas

Para la construcción de las ribosondas se utilizaron plásmidos que contenían la secuencia de DNA codificante para los genes *Notch1* y *Hes1* de pollo. El DNA plasmídico se extrajo y posteriormente se amplificó a través de la cepa de bacterias *Escherichia Coli* TOP10®, suministrada por el laboratorio de Neurociencias del Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia.

Estas bacterias se hicieron competentes por medio del método de cloruro de calcio, con el fin de preparar la membrana celular bacteriana para la entrada del DNA plasmídico (transformación). La transformación de las bacterias competentes se realizó por medio del método de choque térmico.

Posteriormente se promovió el crecimiento de las bacterias transformadas en medio LB/ampicilina líquido, para luego realizar una miniprep con el kit de purificación de DNA (Quiagen®) con el objetivo de extraer y purificar el DNA amplificado y utilizarlo como molde para la construcción de las ribosondas. Después de la purificación, el DNA debió ser linearizado por medio de las enzimas de restricción EcoRI, BamHI y HindIII (Fermentas®), según el plásmido. A través de electroforesis en gel de agarosa al 1% se confirmó la presencia de DNA plasmídico circular y linealizado de los tamaños correspondientes. La síntesis de la ribsonda antisentido se llevó a cabo *in vitro*, utilizando RNA polimerasa T3 o T7, según el gen (Roche®) y nucleótidos marcados con digoxigenina UTP (DIG) (Roche®). Esta síntesis se purificó y confirmó por medio de electroforesis en gel de agarosa 1%.

4.4 ISH en cortes histológicos

Para la realización de la Hibridación *in situ* (ISH), se llevaron a cabo cortes coronales, de 8 µm de espesor, sobre los embriones embebidos en cubos de parafina. Tal procedimiento se realizó en el micrótomos del Laboratorio de Neurociencias en el IGUN. Los cortes se colocaron en láminas, las cuales se almacenaron entre 1 y 5 días a temperatura de -20°C hasta el momento de la realización del procedimiento (Anexos D, E)

Al momento de poder realizar tres replicas por gen/estadio, se procedió a hacer el procedimiento de hibridación *in situ* (Anexo F) sobre los cortes coronales del encéfalo del embrión de pollo en cada uno de los cuatro estadios de interés.

4.5 Análisis de patrones de expresión

Las láminas con los cortes se montaron con glicerol al 80%. Una vez montadas, las láminas fueron almacenadas en una caja organizadora de forma que estuvieran protegidas de la exposición a la luz. Posteriormente, se realizó registros fotográficos de secciones histológicas en microscopio Zeiss Axio Imager.D2m con cámara Axiocam Hmr3 para identificar áreas de expresión de manera global y detallada por tejidos (regiones DM, DL, DM, así como la formación de la región VL de la zona ventral en forma de V), respectivamente mediante el programa Zeiss Zen Pron 2011. Por último, se realizó ajustes de brillo y contraste de imágenes con el programa Adobe Photoshop CS6, se vectorizaron para ilustrar los resultados con el programa Adobe Illustrator CS6 mediante el uso de una tableta digitalizadora Wacom Intuos Draw, y finalmente se diagramaron las imágenes para presentación con el programa Adobe InDesing CS6.

5.Resultados y Discusión.

A continuación, se presentan los resultados y la respectiva discusión de los patrones de expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* en cortes histológicos en sentido coronal de embrión de pollo mediante la técnica de hibridación *in situ* (ISH) identificados en este trabajo.

Se utilizaron 24 embriones de pollo, 3 réplicas por estadio, para cada uno de los dos genes seleccionados, de los cuales se muestran un conjunto por cada combinación gen/estadio. Estos embriones fueron preparados y estudiados de acuerdo con la metodología ya estandarizada previamente por investigadores del instituto de Genética (Bayona, 2012; Carbonell, 2012; Gutiérrez, 2014) los cuales son antecedentes, técnicos y metodológicos, del presente estudio, en la medida que son investigaciones realizadas sobre componentes de la vía Notch en embriones de pollo mediante ISH. La especificidad de las sondas sintetizadas en nuestro laboratorio fue confirmada evaluando áreas de expresión previamente reportadas como controles positivos en nuestras muestras (Figura 5-1). Así, la especificidad de la sonda para el gen *Notch1* fue establecida teniendo en cuenta la expresión del gen reportada previamente en la vesícula ótica a partir de HH14 (Abello et al, 2007). De igual manera, la expresión de *Hes1* también se ha reportado en la región intersomitica en HH19 (Vasiliauskas, Laufer & Stern, 2003).

De igual manera, aunque se usó la misma sonda previamente confirmada, para la presente investigación al realizar la estandarización del protocolo se comprobó de nuevo la especificidad de la ribsonda comparando los patrones de expresión reportados en la investigación de Carbonell (2012) en el estadio HH23 para *Notch1* y HH21 para *Hes1* en embrión completo, donde se reportaron sitios de expresión de los genes de interés (Figura 5-2). De igual manera, se confirmó por medio de electroforesis en gel de agarosa 1%.

Figura 5-1: Especificidad de las sondas utilizadas para evaluar la expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* en embriones de pollo.

A - B) Patrones de expresión de *Notch1* (Abello et al, 2007) y *Hes1* (Vasiliauskas et al, 2003) previamente reportados. C - D) Patrones de expresión obtenidos para los mismos genes en la línea de investigación en el laboratorio. A y C, expresión de *Notch1* en vesícula ótica en HH14. B y D, se observa la expresión de *Hes1* en región intersomitica caudal en HH19.

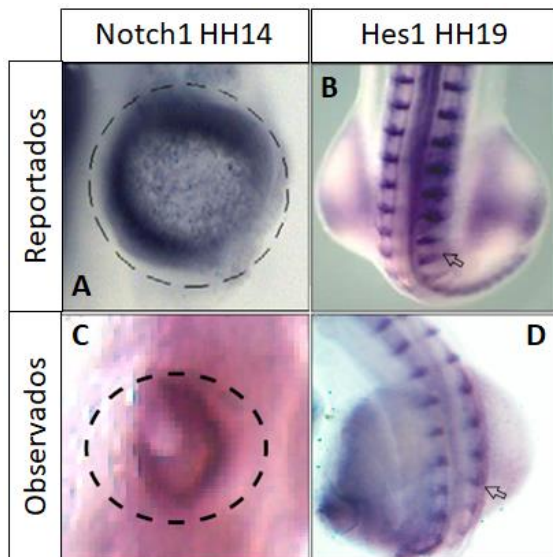
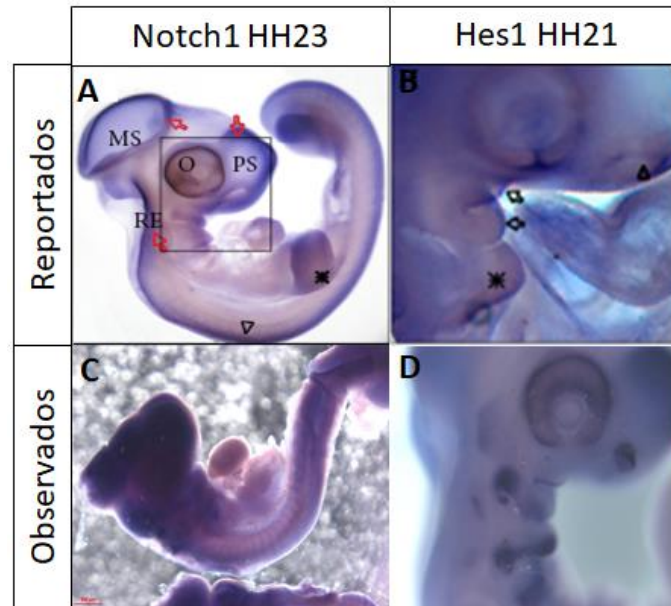


Figura 5-2: Controles positivos de los patrones de expresión de *Notch1* y *Hes1* en prominencias faciales durante el estadio HH23 y HH21 respectivamente.

Hibridación *in situ* sobre embriones completos. A-B) Patrones de expresión reportados previamente en la investigación de Carbonell (2012). C - D) Patrones de expresión obtenidos en el presente estudio. A) Vista lateral panorámica del embrión completo reportado previamente en el estudio de Carbonell (2012) en estadio HH23 para el gen *Notch1*. B) Ampliación en detalle de las prominencias y arcos branquiales reportada por Carbonell (2012) en el estadio HH23 para el gen *Hes1*. C) Vista lateral panorámica usada para controlar la expresión positiva. Se detectó expresión de *Notch1* en estructuras descritas previamente en el telencéfalo, mesencéfalo, bordes romboencefálicos, bordes apicales de los esbozos de extremidades superiores e inferiores. D) Vista sagital a nivel de la prominencia frontonasal y fosita nasal.



El trabajo de Bayona (2012) sobre la expresión de componentes de la vía Notch en arcos branquiales en embrión completo de pollo, determinó que dichos componentes están presentes en los HH14 a HH18, y manifiestan patrones específicos. También, pudo determinar que en la formación de los arcos branquiales no hay una correspondencia de los genes estudiados *Hes1*, *Hey1* y *Serrate2* por lo que se podría suponer que estos genes están involucrados con otros genes de la vía Notch o inclusive otra vía de señalización celular. Carbonell (2012) por su parte, buscó identificar patrones de expresión de varios componentes de la vía Notch durante el desarrollo de las prominencias faciales tanto en embrión completo como en cortes histológicos, tras lo cual concluyó en el desarrollo temprano de las prominencias maxilar, mandibular y frontonasal hay expresión de genes pertenecientes a la vía Notch, específicamente *Notch1*, *Serrate2*, *Hes1* y *Hey1* en los estadios HH19 a HH23. Por otra parte, el estudio de Gutiérrez (2014) planteó los que genes *Notch2* y *Serrate1* durante el desarrollo de arcos branquiales y prominencias faciales en el desarrollo del pollo tanto en embrión completo y cortes histológicos en los estadios HH14 a HH23 se expresan durante el desarrollo de arcos branquiales, de forma aparentemente simultánea, indicando que tienen un rol potencialmente importante en la morfogénesis facial; mientras tanto el gen *Delta1* no se expresa en las estructuras evaluadas, tan solo se observa al inicio de la formación de arcos branquiales, por lo que su expresión se observó de forma diferencial respecto a los otros dos genes escogidos.

Teniendo estos trabajos como antecedentes, se estableció la posible expresión del gen *Notch1* en los estadios HH34 y HH36 en los cortes realizados a los distintos cerebros de los embriones de pollo. Particularmente, los análisis realizados a los cortes histológicos mostraron la expresión de estos genes de la vía Notch en las áreas DM, DL, DM, así como la formación de la región VL de la zona ventral en forma de V. También se encontró expresión de este gen en otras zonas del cerebro (Tracto septomesencefálico (TSM); Ventriculos laterales (VL); Lámina medular dorsal (LMD); Paleostriatum Augmentatum (PA); Arcopallio y subdivisiones, par dorsal (Ald) (Figura 5-3 y Figura 5.4); así como en la conformación del tallo cerebral) que dan cuenta de la posible intervención de esta vía no sólo en el neurodesarrollo del hipocampo sino además de otras regiones y estructuras en los estadios estudiados.

Figura 5-3: Resultados para el gen *Notch1* en estadio HH34.

A) Vista general a 25x de corte histológico coronal a 8µm de un cerebro de embrión de pollo. Expresión en el hipocampo y sus regiones (región dorso medial (DM), región dorso lateral (DL), región triangular (T), y los brazos ventro medial (VM) y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V, así como las regiones cerebro (Tracto septomesencefálico (TSM); Ventriculos laterales (VL); Lámina medular dorsal (LMD); Paleostriatum Augmentatum (PA); Arcopallio y subdivisiones, par dorsal (Ald). B) Zoom a 50x del corte, sobre región hipocampal. C) Zoom a 100x del corte. Se puede detallar las regiones VM y DM de los dos hemisferios. D) Zoom a 200X. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. En verde, expresión del gen; en naranja, zonas del hipocampo sin expresión.

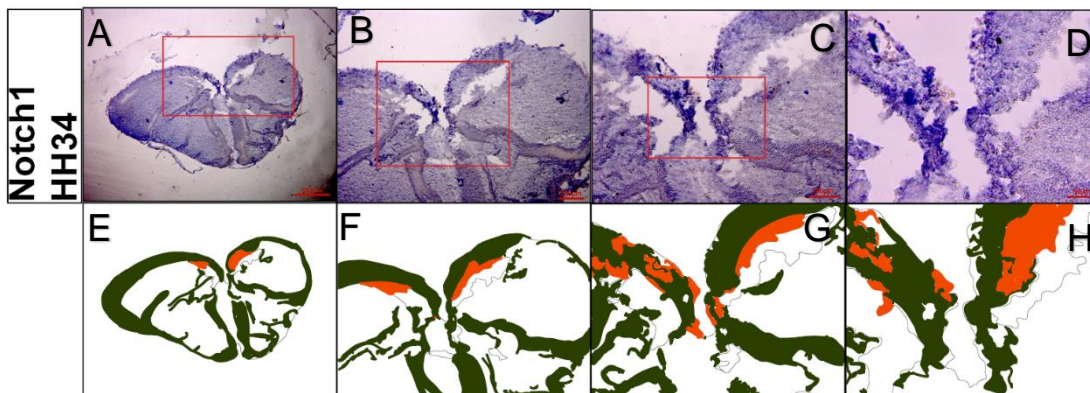
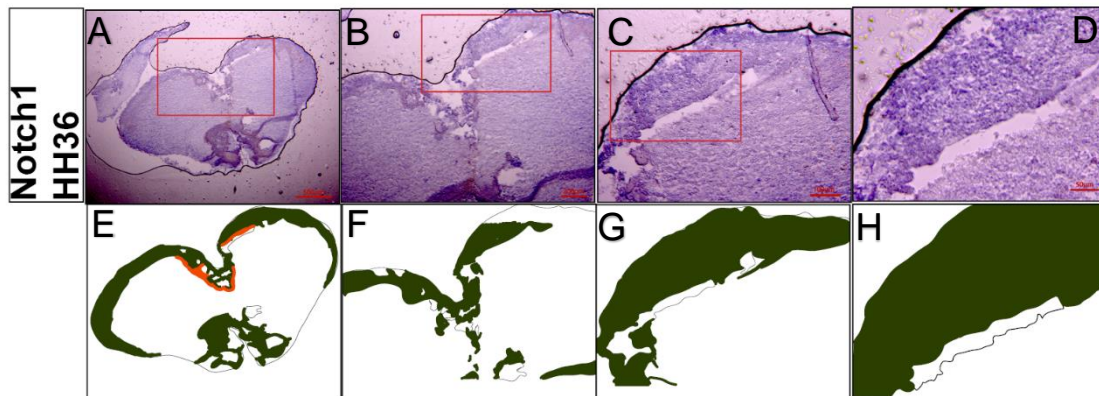


Figura 5-4: Resultados para el gen *Notch1* en estadio HH36.

A) Vista general a 25x de corte histológico coronal a 8µm de un cerebro de embrión de pollo. Expresión en el hipocampo y sus regiones (región dorso medial (DM), región dorso lateral (DL), región triangular (T), y los brazos ventro medial (VM) y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V). B) Zoom a 50x del corte, sobre región hipocampal. C) Zoom a 100x del corte. Se puede detallar las regiones VM y DM de los dos hemisferios. D) Zoom a 200X. E-H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. En verde, expresión del gen.



En el estadio HH38, aunque se encuentran patrones de expresión, no se encuentra consistencia entre las distintas láminas analizadas (Figura 5-5). Para el estadio HH40, no se encontró expresión del gen *Notch1*, ni en las estructuras de interés, ni en otras regiones cerebrales (Figura 5-6). Por tanto, posiblemente, el receptor de *Notch1* se ha silenciado, y probablemente sólo actúe en estadios más tempranos del desarrollo.

Figura 5-5: Resultados para el gen *Notch1* en estadio HH38.

No hay evidencia de expresión del gen. A) Vista general a 25x de corte histológico coronal a 12 µm de un cerebro de embrión de pollo. No hay indicios de la expresión del gen. B) Zoom a 50x del corte. No se aprecia expresión. C) Zoom a 100x del corte. No se aprecia expresión. D) Zoom a 200x del corte. No se aprecia expresión. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. En naranja, hipocampo.

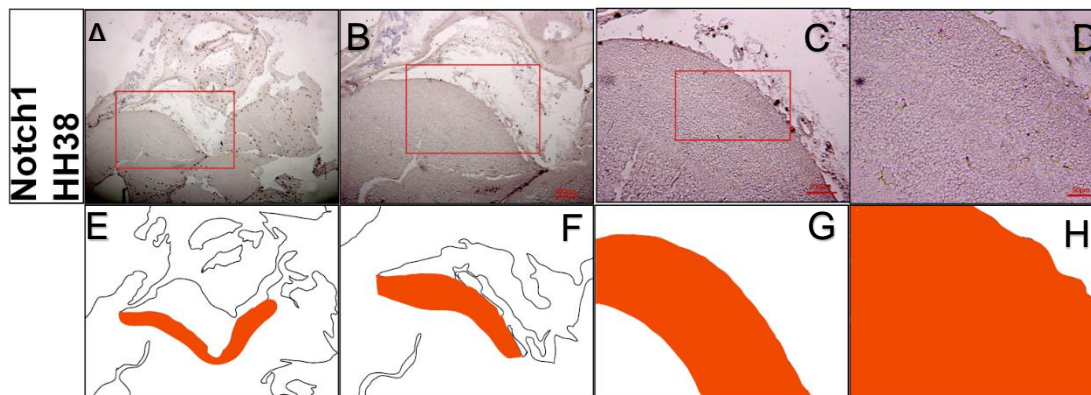
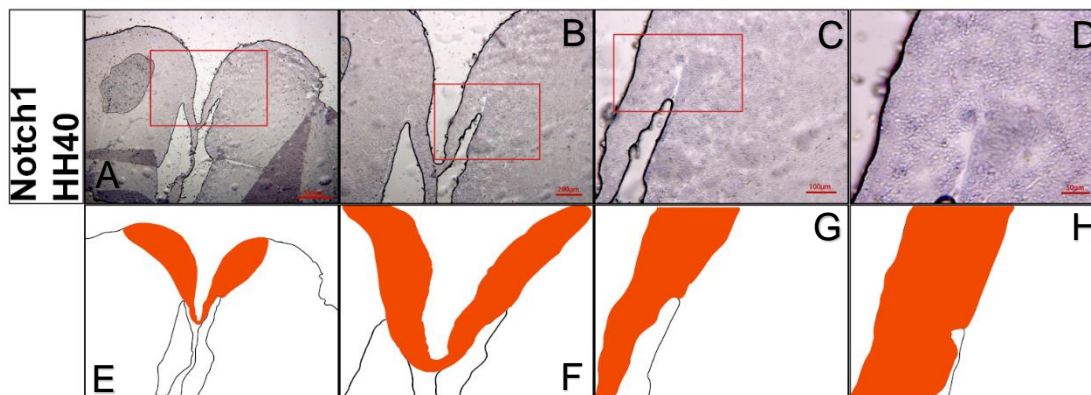


Figura 5-6: Resultados para el gen *Notch1* en estadio HH40.

No hay evidencia de expresión del gen. A) Vista general a 25x de corte histológico coronal a 12um de un cerebro de embrión de pollo. B) Zoom a 50x del corte. No se aprecia expresión. C) Zoom a 100x del corte, sobre región hipocampo. No se aprecia expresión. D) Zoom a 200x del corte, en el hemisferio izquierdo. No se aprecia expresión. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. En naranja, hipocampo.



De acuerdo con los resultados descritos, se puede señalar: 1. Existe expresión del gen *Notch1* en los estados HH34 y HH36. Específicamente, en las áreas DM, DL, DM, así como la formación de la región VL de la zona ventral en forma de V que conforman el hipocampo de pollo. Como dato adicional, también se encontró expresión del gen en las regiones TSM, VL, LMD, PA, Ald y parte de la medula ósea, que, si bien no eran estructuras cerebrales de interés del presente estudio, podría dar cuenta de la diferenciación celular en dichas áreas mencionadas en los estadios estudiados. Serían necesarios nuevos estudios que permitan corroborar la posible intervención de genes de la vía Notch en las áreas mencionadas que no corresponden al hipocampo de pollo. 2. No es clara la expresión de *Notch1* en los estadios HH38 y HH40. En el caso de HH38, se encontró mayor dificultad

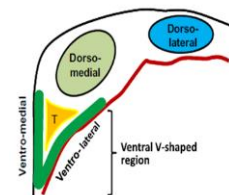
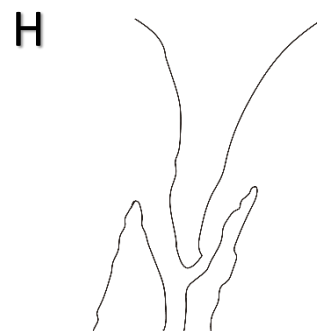
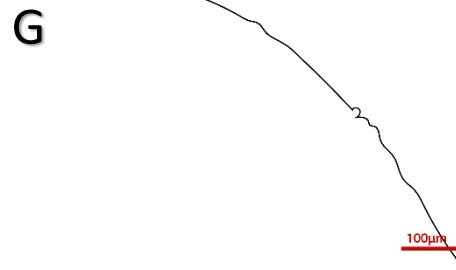
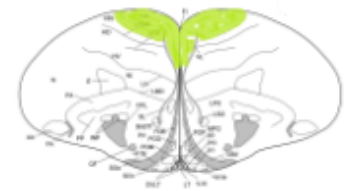
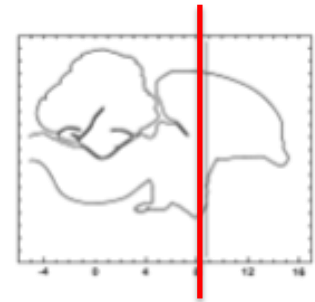
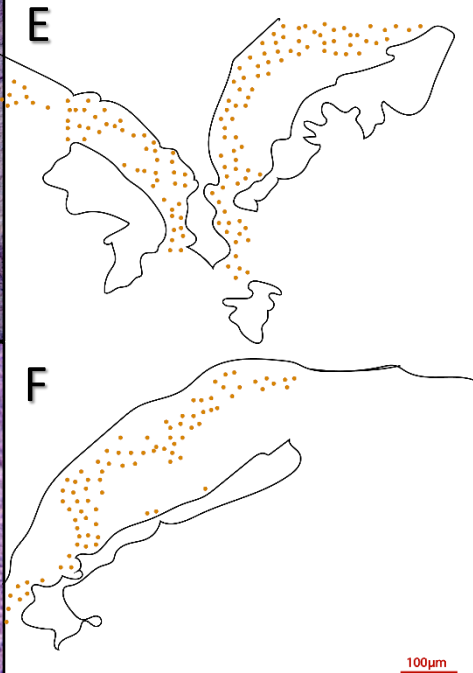
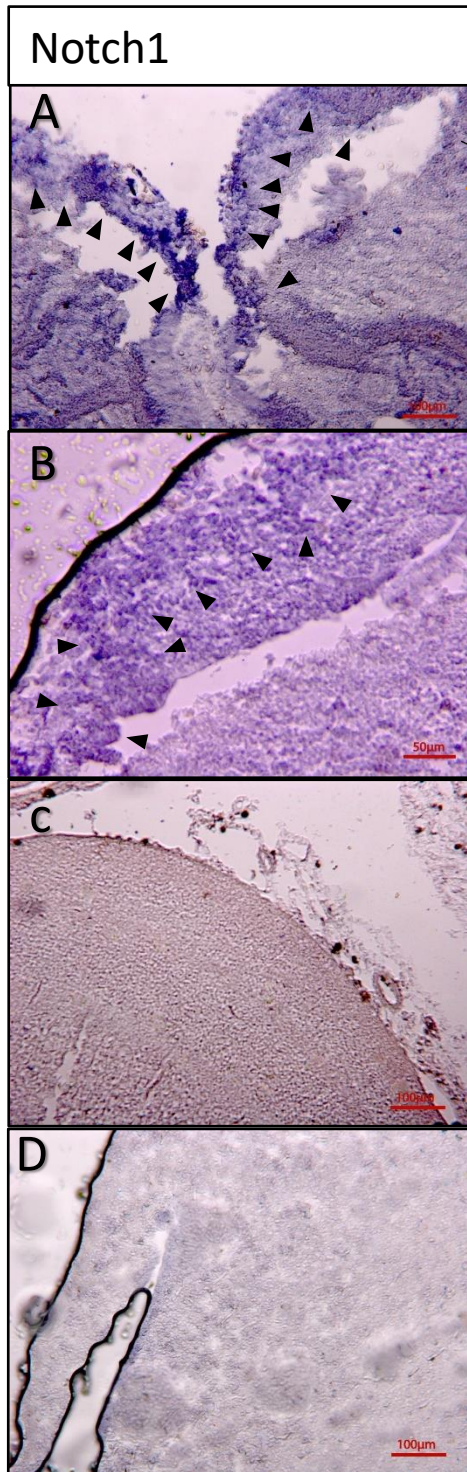
en la medida que los cortes presentaron rupturas. Se buscó repetir los cortes de este estadio, tras lo cual no se encontró la expresión del gen. Para HH40, los análisis realizados no dan cuenta de la expresión del gen en ninguna región cerebral en los cortes realizados.

3. Ante la posibilidad que haya una expresión diferencial como la reportada por Gutiérrez en su investigación (2014), dado la expresión del gen se observó en los estadios HH34 y HH36 y no en los estadios HH38 y HH40, es necesario plantear nuevos estudios donde se estudie la posible expresión del gen en estadios previos a los seleccionados de acuerdo con la literatura. De esta manera, es necesario comprobar si hay expresión de este gen en estadios HH26 a HH32 en el desarrollo y conformación de las estructuras cerebrales y específicamente en aquellas regiones que llevarán a la formación del hipocampo.

Según estos resultados, al parecer podría señalarse la participación del gen *Notch1* en la formación del hipocampo de pollo y que su papel como receptor podría estar involucrado en el proceso de diferenciación celular (función que se le atribuye en la literatura), así como otras regiones en el cerebro de pollo, sin poder comprobar en el presente estudio dicha hipótesis.

Figura 5-7: Resumen de resultados para gen *Notch1*.

Relación de los patrones de expresión del gen *Notch1* en los estadios HH34 a HH40 en cortes histológicos coronales 12µm de un cerebro de embrión de pollo. Las flechas negras indican expresión del gen. A) Zoom a 200x del corte, sobre región del hipocampo en ambos hemisferios en el estadio HH34. B) Zoom a 200x del corte, sobre región del hipocampo hemisferio izquierdo en el estadio HH36. C) Zoom a 200x del corte, sobre región del hipocampo en hemisferio derecho en el estadio HH38. D) Zoom a 200x del corte, sobre región del hipocampo en hemisferio izquierdo en el estadio HH40. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. Las estrellas de color naranja señalan donde hay expresión del gen.



Respecto al gen *Hes1*, analizando la ubicación anatómica de las áreas de interés, se ha logrado establecer la expresión del gen *Notch1* en los estadios HH34 a HH40 en los cortes realizados a los distintos cerebros de los embriones de pollo. Particularmente, los análisis realizados a los cortes histológicos dan cuenta del desarrollo de las áreas DM, DL, DM, así como la formación de la región VL de la zona ventral en forma de V (Figura 5-8). Además, al parecer en ciertos cortes también se presenta expresión del gen en la conformación del tallo cerebral (Figura 5-8).

Figura 5-8: Resultados para el gen *Hes1* en estadio HH34

A) Vista general a 25x de corte histológico coronal a 8µm de un cerebro de embrión de pollo. A pesar de que el tejido se ha roto y no es fácilmente apreciable el hemisferio izquierdo, se encuentra expresión en el hipocampo y sus regiones (región dorso medial (DM), región dorso lateral (DL), región triangular (T), y los brazos ventro medial (VM) y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V). Además, se puede observar expresión en el ventrículo izquierdo. B) Zoom a 50x del corte sobre región hipocampo. C) Zoom a 100x del corte, sobre región hipocampal. Se puede detallar las regiones VM y DM de los dos hemisferios. D) Zoom a 200x del corte. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. En verde, expresión del gen; en naranja, zonas del hipocampo sin expresión.

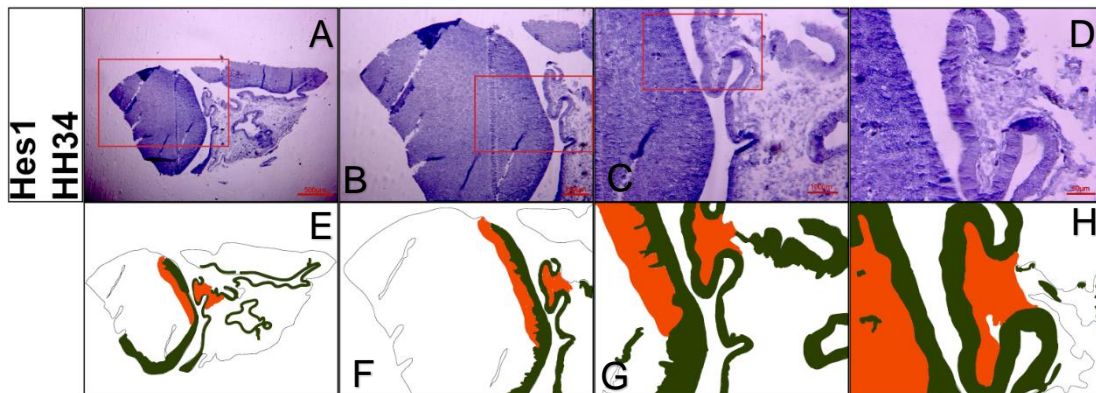
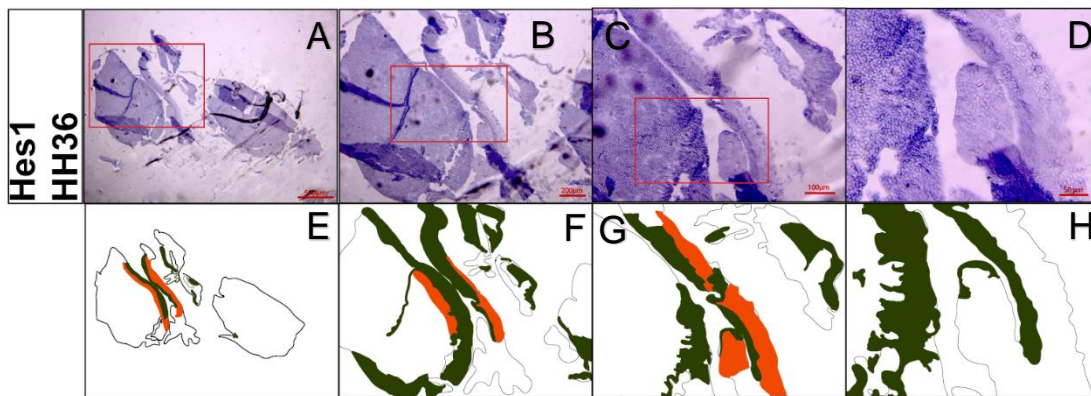


Figura 5-9: Resultados para el gen *Hes1* en estadio HH36.

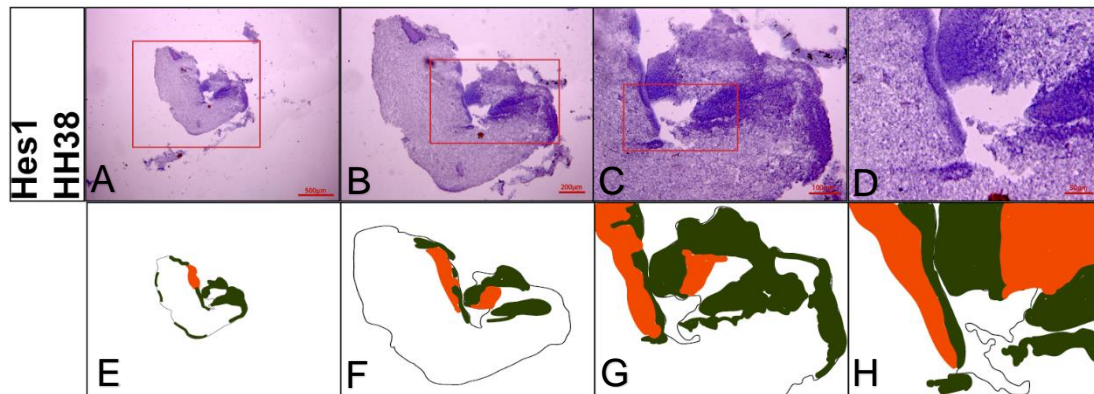
A) Vista general a 25x de corte histológico coronal a 8µm de un cerebro de embrión de pollo. A pesar de que el tejido se ha roto, se encuentra expresión en el hipocampo (región dorso medial (DM), región dorso lateral (DL), región triangular (T), y los brazos ventro medial (VM) y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V). Debido a la forma que se encuentra plegado el hemisferio izquierdo, no es posible observar las regiones ventriculares. B) Zoom a 50x del corte sobre región hipocampo. C) Zoom a 100x del corte, sobre región hipocampal. Se puede detallar las regiones VM y DM de los dos hemisferios. D) Zoom a 200x del corte. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. En verde, expresión del gen; en naranja, zonas del hipocampo sin expresión.



Como dato adicional, se encuentra que hay expresión en los ventrículos laterales (Figuras 5-10, 5-11). Siguiendo el proceso de formación de las distintas estructuras cerebrales, es posible determinar cómo los ventrículos hacen un proceso de cierre, durante el cual se encuentra expresión del gen *Hes1* al tiempo que se realiza una forma series de haces compactos que parecen estructurar el borde del ventrículo como tal. A diferencia del gen *Notch1*, en el caso de *Hes1* no parece hacer expresión en otras regiones y estructuras además de las ya mencionadas. Por tal motivo, la intervención del gen *Hes1* es más específica y localizada en el neurodesarrollo del hipocampo, además de otras estructuras y regiones cerebrales en los estadios estudiados. Esto, a pesar de que durante la realización de la hibridación *in situ* y antes, hubo gran pérdida de tejido y deformación de este.

Figura 5-10: Resultados para el gen *Hes1* en estadio HH38.

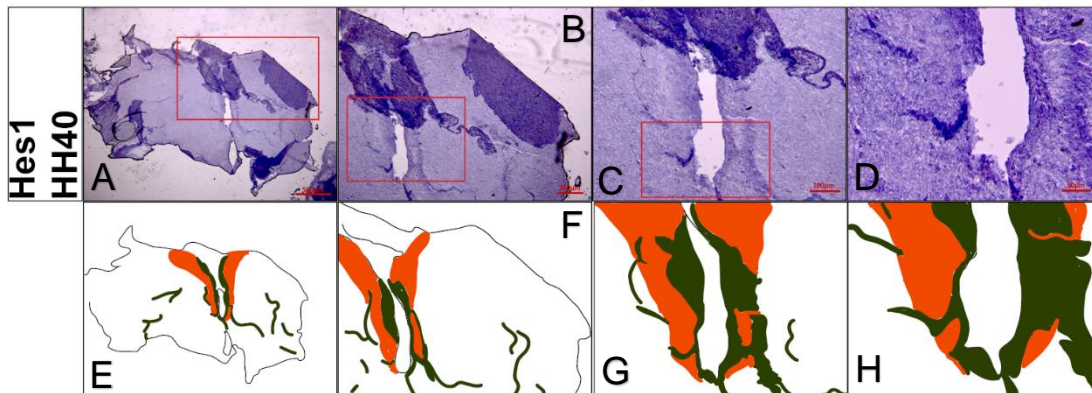
A) Vista general a 25x de corte histológico coronal a 8µm de un cerebro de embrión de pollo. A pesar de que el tejido se ha roto, se observa expresión en el hipocampo (región dorso lateral (DL), región triangular (T), y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V). B) Zoom a 50x del corte sobre región hipocampo. C) Zoom a 100x del corte, sobre región hipocampal. Se puede detallar las regiones VM y DM de los dos hemisferios. D) Zoom a 200x del corte. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. En verde, expresión del gen; en naranja, zonas del hipocampo sin expresión.



Según lo anteriormente señalado, se puede señalar: En primer lugar, existe expresión del gen *Hes1* en los estados HH34 a HH40. Específicamente, en las áreas DM y en la región VL de la zona ventral en forma de V que conforman el hipocampo de pollo. En segundo lugar, se encontró expresión del gen en los ventrículos laterales, al tiempo que se puede seguir el proceso de cerramiento de dichas estructuras, lo que se considera de importancia que, si bien no era interés del presente estudio, también dan cuenta de la diferenciación y migración celular, procesos importantes en el neurodesarrollo. En tercer lugar, a diferencia del gen *Notch1*, no parece haber expresión del gen *Hes1* en otras regiones cerebrales. En cuarto lugar, dado que la expresión de *Hes1* se presentó de manera muy localizada y específica, parece que el rol que juega este gen en el desarrollo del hipocampo es más claro que otros genes. En el estadio HH40, al encontrarse la expresión en el cierre de los ventrículos, al parecer el gen *Hes1* puede tener una importancia destacada en dicho proceso.

Figura 5-11: Resultados para el gen *Hes1* en estadio HH40.

A) Vista general a 25x de corte histológico coronal a 8µm de un cerebro de embrión de pollo. Se encuentra expresión en el hipocampo (región dorso lateral (DL), región triangular (T), y ventro lateral (VL) de la región ventral en forma de V). Se observa además el cerramiento de los ventrículos, y expresión del gen en dichas zonas, así como organización celular en un patrón específico. B) Zoom a 50x del corte sobre región hipocampo. C) Zoom a 100x del corte, sobre región hipocampal. Se puede detallar las regiones VM y DM de los dos hemisferios. D) Zoom a 200x del corte. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. En verde, expresión del gen; en naranja, zonas del hipocampo sin expresión.

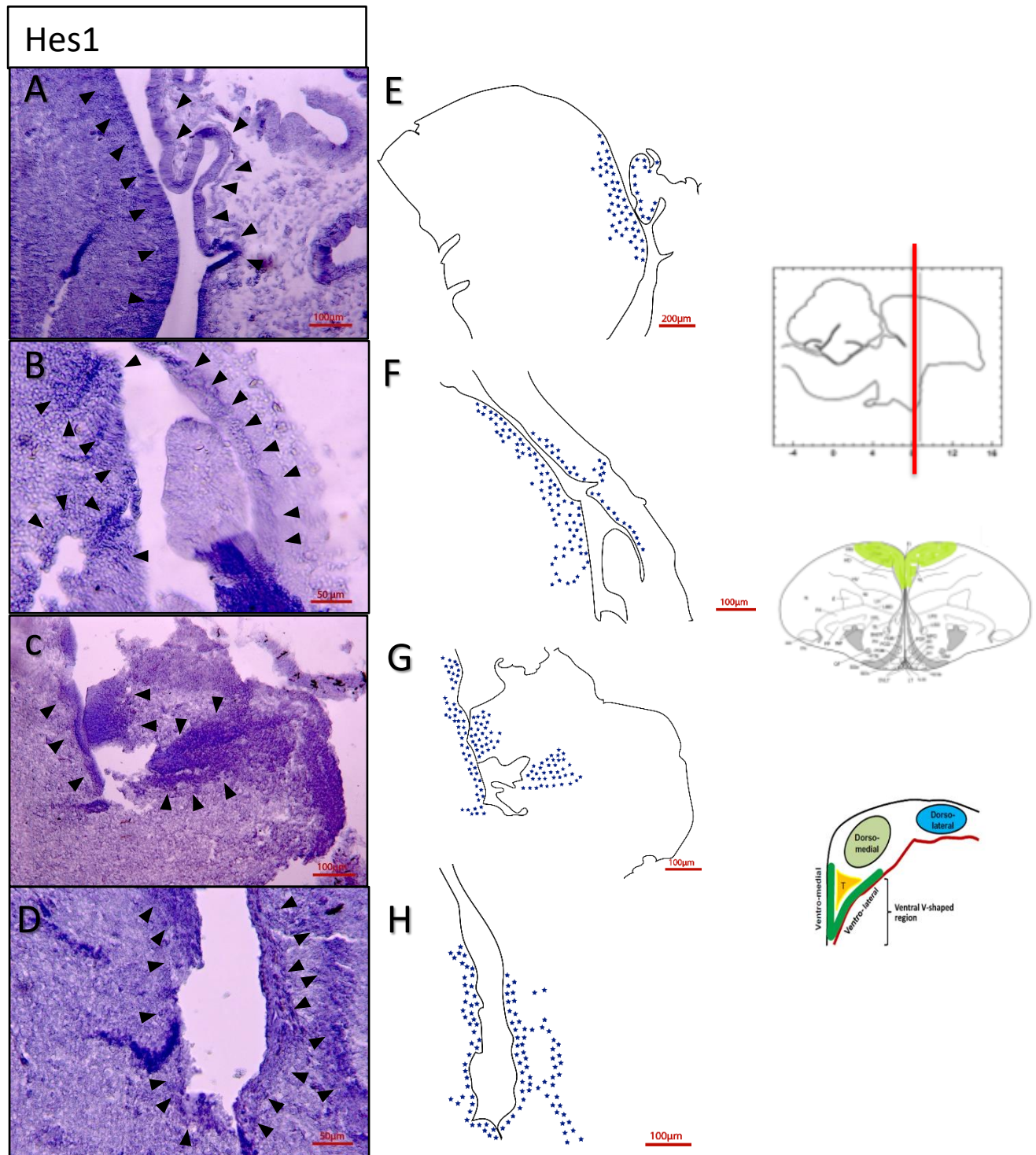


Según estos resultados, se podría hipotetizar la posible participación del gen *Hes1* en la formación del hipocampo de pollo y que su papel como ligando estaría involucrado en el proceso de diferenciación celular (función que se le atribuye en la literatura, Bae et al, 2002; Kageyama et al, 2000; 2009; Kobayashi et al, 2009; Kageyama, 2010; Kubota et al, 2012; Tan et al, 2012; Barton y Fendrik, 2013), más no en otras regiones de cerebro de pollo (Kageyama et al, 2009), reportes que ayudan a entender el papel de *Notch1* en la proliferación celular, y de *Hes1* en la diferenciación de los progenitores celulares. Se podrían realizar en investigaciones futuras estudios de pérdida y ganancia de función.

Figura 5-12: Resumen de resultados para el gen *Hes1*.

Relación de los patrones de expresión del gen *Hes1* en los estadios HH34 a HH40 en cortes histológicos coronales 12µm de un cerebro de embrión de pollo. Las flechas negras indican expresión del gen. A) Zoom a 200x del corte, sobre región del hipocampo en ambos hemisferios en el estadio HH34. B) Zoom a 200x del corte, sobre región del hipocampo hemisferio izquierdo en el estadio HH36. C) Zoom a 200x del corte, sobre región del hipocampo en hemisferio derecho en el estadio HH38. D) Zoom a 200x del corte, sobre región del hipocampo en hemisferio izquierdo en el

estadio HH40. E - H) Correspondencia esquemática de las regiones de acuerdo con las aplicaciones anteriormente descritos. Los círculos de color azul señalan donde hay expresión del gen.



Teniendo en cuenta los patrones de expresión descritos, se concluye que: 1) Los genes seleccionados, *Notch1* y *Hes1*, siendo parte de la misma vía de señalización celular, tienen patrones de expresión similares, pero no iguales, en el hipocampo de pollo (Tabla 5-1 y Figura 5-13). Particularmente, se encuentra similitud de su expresión en las regiones DM y en la formación de la región VL de la zona ventral en forma de V. Por el contrario, en las regiones DL y VL de la zona ventral se puede identificar la expresión de *Notch1* más no la de *Hes1*. 2) También se puede apreciar una diferencia en los estadios seleccionados. En el caso de *Notch1*, la expresión del gen se identifica en los estadios HH34 y HH36 principalmente, mientras que no se puede concluir expresión en estadio HH38, y no se observa en HH40. En el caso del gen *Hes1*, se identifica expresión en los estadios HH34 a HH40. 3) Hubo una expresión diferencial de los dos genes estudiados, de forma similar a lo reportado por Bayona (2012) y Gutiérrez (2014). La expresión de *Notch1* se pudo corroborar en otras regiones del cerebro que no eran de interés del estudio (TSM, VL, LMD, PA, Ald y parte de la medula ósea). Pero, no es posible observar la expresión de *Hes1* en esas mismas áreas anatómicas. Por el contrario, el gen *Hes1* se identifica en las regiones ventriculares y subventriculares (Kageyama, 2009), donde inclusive, se puede observar una organización celular particular, lo que podría estar dando cuenta de procesos de diferenciación y migración relacionados con dichas regiones del cerebro. Estas diferencias entre los dos genes de interés podrían deberse a la hipótesis que como se trata del gen de un receptor y un gen efector, puede que no haya una correspondencia o interacción directa entre los dos componentes de la vía Notch, es decir, que *Notch1* podría estar trabajando en conjunto con otro ligando, y *Hes1* con otro receptor, además de la actividad propia de *Hes1* (Kageyama 2009; 2010; Marathe y Alberti, 2015). Dada esta hipótesis, serían necesarios nuevos estudios que permitieran corroborarla o indagar más, revisando la expresión de otros genes de la vía Notch en el desarrollo hipocampal.

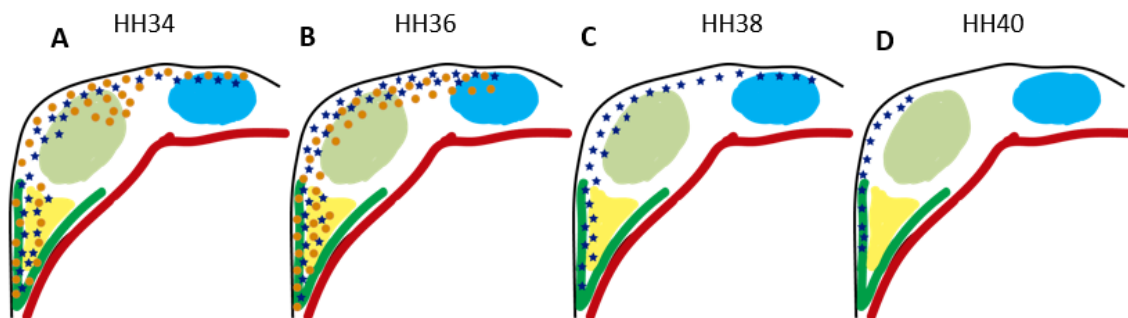
Tabla 5-1: Distribución temporal y espacial de los patrones de expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* en las regiones que conforman el hipocampo de pollo.

Relación de cada uno de los genes estudiados en las distintas áreas que componen el hipocampo de pollo, como en otras áreas observadas que no eran objetivo del presente estudio, en los estadios HH34 a HH40. Las cruces (+) representa las señales positivas para cada gen estudiado.

		Gen							
Región		Notch1				Hes1			
		Estadio				Estadio			
		34	36	38	40	34	36	38	40
Hipocampo	DM	+	+			+	+	+	+
	DL	+	+			+	+	+	
	T	+	+			+	+	+	
	VM	+	+			+	+	+	+
	VL	+				+	+		

Figura 5-13: Distribución temporal y espacial de los patrones de expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* en las regiones que conforman el hipocampo de pollo.

Relación de cada uno de los genes estudiados en las distintas áreas que componen el hipocampo de pollo, como en otras áreas observadas que no eran objetivo del presente estudio, en los estadios HH34 a HH40. Los círculos azules representan las señales positivas para *Notch1* y las estrellas naranjas las señales positivas para *Hes1*. Las regiones del hipocampo: en azul claro, región dorso lateral (DL); en verde pálido, región dorso medial (DM); en verde oscuro, regiones ventro medial y ventro lateral (VM y VL); en amarillo, región triangular (T). A) Estadio HH34. B) Estadio HH36. C) Estadio HH38. D) Estadio HH40



De manera interesante, recientemente varios autores han buscado establecer una relación entre componentes de la vía Notch y la memoria (Mody et al, 2001; Crews et al, 2008), estudios de interés respecto a las áreas anatómicas estudiadas. Estos estudios no tienen en cuenta el neurodesarrollo de las estructuras, pero si tienen en cuenta la relación entre distintos componentes de la vía Ntoch en el modelo de pollo (Hayashi et al, 1996), pero son interesantes en la medida que buscar una posible relación entre estos mecanismos de proliferación y diferenciación celular con un proceso importante para la supervivencia del organismo (Stewart, 2003; Chaudhury et al, 2008; Carlson, 2014)

Estudios de expresión genética en el hipocampo de ratón como el de Mody et al (2001), permiten el planteamiento de otras investigaciones. En su artículo de 2003, Costa, Honjo y Silva buscan dan cuenta de la posible relación entre la vía Notch y de los síndromes de Alagille y Cadasil, que están asociados con retraso mental y demencia. En su estudio, ratones adultos con alteraciones en *Notch1* fueron evaluados en pruebas comportamentales y de memoria, donde se encontró déficits en memoria espacial y aprendizaje. De acuerdo con los resultados obtenidos, según Costa et al (2003), de acuerdo con los mecanismos de esta vía y su interacción con presinilinas 1 y 2 (PS1 y PS2) y la proteína precursora de β -amiloide (APP) además de las alteraciones con el gen *Notch1*, se puede establecer relación con la enfermedad de Alzheimer. Los resultados de Costa et al, aunque muestran una relación entre la memoria espacial y uno de los genes estudiados de la vía Notch, no detallan el estudio del hipocampo, o la manera en que la alteración en *Notch1* afecta los procesos estudiados por los autores.

Wang et al (2004) estudiaron ratones modificados los cuales tenían bajos niveles de expresión de *Notch1*, bajo el supuesto de la misma relación que tiene esta vía con la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer dada la interacción de la vía con PS1, PS2 y APP. Estos autores analizan cortes de hipocampo mediante métodos electrofisiológicos, y sus resultados reportan que Notch regula la plasticidad sináptica en la región CA1, y que *Notch1* mejora la potenciación a largo plazo, aunque no pueden establecer los mecanismos por los cuales este gen participa en la regulación de la plasticidad sináptica. Sin embargo, describen y resaltan cómo la vía Notch está involucrada en el aprendizaje y memoria.

De igual manera, en su reporte Yoon y Gaiano (2005) hablan sobre la relación encontrada en ratones entre la vía de señalización y PS1 / PS2. En particular, destacan esta relación en animales adultos y recién nacidos. Los datos señalados por estos autores no permiten establecer si los defectos observados se deban como tal a la alteración de la vía Notch observada en la vida adulta, o si se deba a un problema no descrito durante el neurodesarrollo. En particular, no pueden determinar si los déficits observados se deben a la falta de señalización de *Notch1* en neuronas o en zonas germinales postnatales como la zona subgranular (ZSG) del giro dentado.

Oya et al (2009) estudiaron el papel de *Notch1* después de una isquemia global transitoria en ratas. En la fase aguda de la isquemia en CA1, se reporta un incremento de células positivas de *Notch1* en la región posterior del ventrículo lateral, además de ser regulado a la alta días después en dicha región del hipocampo. En contraste, la atenuación de la señalización, por la administración de inhibidor de γ -secretasa después del 5 día de la isquemia, aumentó la cantidad de neuronas inmaduras migrantes y produce una diferenciación más eficiente de los promotores neuronales, en contraste con lo reportado en la literatura, y del rol de Hes1 como efector de la vía Notch (Yoon y Gaiano, 2005). De esta manera, se puede encontrar una relación entre *Notch1* y la neurogénesis en regiones del hipocampo en la vida adulta.

Kageyama et al (2009) discuten el papel que tiene componentes de la vía Notch en el desarrollo cortical, de forma que cada célula progenitora (bien sea células neuroepiteliales o células radiales gliales) por medio de la división asimétrica se divide en dos células progenitoras neuronales, y cuando se inicia el proceso de división asimétrica las células progenitoras neurales se dividen en una progenitora neuronal y en una neurona inmadura o en una célula progenitora basal, proceso que se repite para generar los distintos tipos de neuronas.

Luego que NICD se transloca al núcleo, forma un complejo con la proteína *RBPj*, la cual funciona como activador transcripcional e induce la expresión de represores transcripcionales como son *Hes1* y *Hes5*. Así, estos genes reprimen la expresión de genes proneurales, lo que lleva a la inhibición de la diferenciación neuronal y el mantenimiento de células progenitoras neurales. De este modo, una neurona diferenciadora impide que las células progenitoras neurales vecinas se diferencien, promoviendo así la división

asimétrica en una célula progenitora neural y una neurona hija diferenciadora, proceso en el que participan ligandos (*Delta*), receptores (*Notch*), mediadores (*RBP*) y efectores (*Hes*). Así, Kageyama reporta en el desarrollo de corteza comparado con el de retina en pez cebra, *NICD* y *Hes1* se expresan con mayor frecuencia en el lado basal de la zona ventricular, lo que para ellos sugiera que Notch está más activo en dicha región. Esta discusión es complementada por el propio autor (Kageyama, 2010) sobre el papel que tiene *Hes1* sobre la expresión de genes proneurales como *Ngn2* (que como se mencionó, a su vez hace parte de la familia de factores de transcripción *bHLH*, relacionados con diferenciación neuronal y con la cual hay una interacción con el complejo *NICD-RBP*). La supresión de la expresión de *Hes1* conduce a una regulación positiva en la expresión de *Ngn2* y *Dll1* (Lasky y Wu, 2005) y a la diferenciación neuronal. Por el contrario, la supresión de la expresión de *Hes1* conduce a una regulación positiva sostenida de la expresión de *Ngn2* y *Dll1* ya la diferenciación neuronal. Por lo tanto, el modo de expresión regulado por *Hes1* de *Ngn2* es importante para los resultados (mantenimiento de las células madre neurales y progenitoras frente a la promoción de la diferenciación neuronal) (Hayashi et al, 1996; Kageyama, 2010).

Por su parte, Marathe y Albini (2015) revisan y discuten el papel de la vía Notch en la formación de memoria en diversas especies, pero el entendimiento de los mecanismos de acción no es claro. Estos autores expresan que cada vez parece haber más evidencia de los cambios de la señalización de *Notch1* en las diferentes fases del establecimiento de la memoria. En la fase de formación de la memoria, después del aprendizaje espacial, la expresión y activación de *Notch1* se induce rápidamente en la región CA del hipocampo y dura hasta ocho horas, coincidiendo con la fase de consolidación de la memoria (Stewart, 2003; Carlson, 2014). Reportan además que la inducción de *Notch1* en la fase de consolidación de la memoria también se ha observado en el giro dentado de las ratas, doce horas después de un entrenamiento de evitación pasiva. Sin embargo, el aumento del receptor de *Notch1* fue interpretado como una lectura de la acumulación de proteínas como la señalización de Notch parecía ser reprimida sobre la base de la regulación a la baja de la transcripción de *Hes1*. Por desgracia, comentan Marathe y Albini (2015) ,el análisis de los objetivos de *Hes1* se limita a las doce horas de acuerdo con lo revisado, lo que deja la duda de si, en este momento, la expresión de *Hes1* sigue una de las oscilaciones de *Hes1* estudiadas por Kageyama et al en los distintos estudios de esos autores (2008, 2009,

2010), lo que podría ayudar a explicar las diferencias encontradas entre los genes *Notch1* y *Hes1* descritas en los resultados de la presente investigación previamente descritos.

A su vez, Marathe y Albin reportan que en estudios con ratones y en *Drosophila*, la disminución o pérdida de *RBPjk* y sus homólogos impacta negativamente la adquisición y consolidación de la memoria espacial. Afirman además que la sobreexpresión de *Hes1* representa una advertencia adicional. De hecho, se ha demostrado que la actividad sostenida de *Hes1* inhibe la señalización Notch al suprimir la actividad oscilatoria de *Hes1*, que es fundamental para la proliferación y mantenimiento de células madre neuronales de acuerdo con lo estudiado por Kageyama et al (2008, 2009, 2010). Si la actividad oscilatoria de *Hes1* ocurre también en neuronas como postulan todos estos autores, la sobreexpresión de *Hes1* puede dificultar la organización de moléculas de señalización que conduzcan a un efecto negativo dominante en la recuperación de memoria.

Por otra parte, Zhang et al (2015a) estudian la neurogénesis en cerebros adultos, con particular interés en la región subgranular del giro dentado y la zona subventricular. Reportan, perfiles de metilación de ADN en los promotores de *Notch1*, *Hes1* y *Ngn2* promotores durante la neurogénesis del DG, en cerebros postnatales, adultos y traumáticos de ratón. Estos autores muestran que hay componentes de la vía Notch que son expresados en las regiones germinales de cerebros postnatales y adultos, dando la posibilidad que la señalización de Notch puede regular células madre neuronales postnatales.

Estos reportes, dan cuenta de la posible relación entre genes de la vía Notch y el hipocampo adulto para procesos clave como el aprendizaje y la memoria, pero no es claro si estos procesos cognitivos pueden verse afectados desde el neurodesarrollo. Es claro, que componentes de la vía Notch están participando en distintos procesos en el hipocampo mamífero tanto postnatal como adulto. Sin embargo, siguen sin ser de todo claros estos componentes en el hipocampo en su neurodesarrollo. Al parecer, la inhibición de la señalización de Notch, una condición conocida para inducir la diferenciación neuronal conduce a la regulación a la baja de *Hes1* y la regulación a la alta de *Ngn2* y *Dll1*. Como la expresión de *Ngn2* sigue un patrón oscilatorio, se podría proponer que esto llevase a niveles de proteína *Ngn2* que son demasiado bajos e insuficientes para estimular la diferenciación neuronal (Zhang et al, 2015a). Entender los patrones de expresión de la

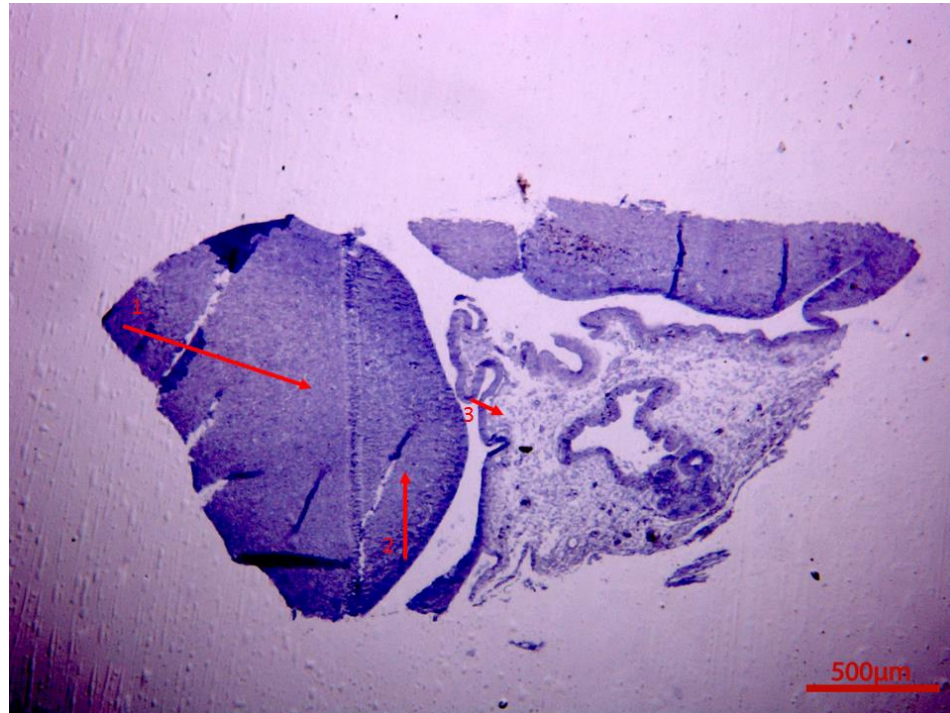
presente investigación, puede ayudar a dar cuenta de la relación desde etapas tempranas del desarrollo hipocampal de posibles afectaciones que tendrían lugar en la vida adulta, si se llegará a dar una alteración en la expresión de los genes de la vía y en la migración neuronal observada, de la cual se hablará más adelante. Es claro, que *Notch1* juega un papel en la proliferación celular, y de *Hes1* en la diferenciación de los progenitores celulares a través de su actividad oscilatoria, y de acuerdo con la literatura revisada, hay una compleja interacción en la regulación de estos genes. Por ello, se hace importante entender el posible papel que *Notch1*, *Hes1*, así como *Dll1* y *Ngn2* pueden estar desempeñando sobre las regiones promotoras de genes de componentes de la vía Notch, y sobre células madre neuronales, y así, explicar la relación observada y descrita en el presente estudio.

Relación de color y luminiscencia

Los datos anteriormente presentados, por las características propias de la técnica de ISH y del procedimiento realizado, únicamente se describieron realizando un análisis cualitativo de los patrones de expresión, puesto que no fue posible realizar una cuantificación para las regiones donde se encontró expresión del gen. Sin embargo, por medio del programa Zeiss Zen Pro 2011 realizó una medición del cambio de densidad del color a través de una medición interactiva de la distancia en micras de dos regiones donde se detectó expresión vs no expresión de cada uno de los dos genes, como indicativo de la expresión del gen en las regiones seleccionadas. En la figura 5-14, se tomó un corte para el gen *Hes1* en el estadio HH34, y se seleccionaron tres puntos donde se identificó la expresión del gen, para realizar la comparación con regiones donde no se identificó la expresión.

Figura 5-14: Corte para el gen *Hes1* en estadio HH34 en vista general a 25x.

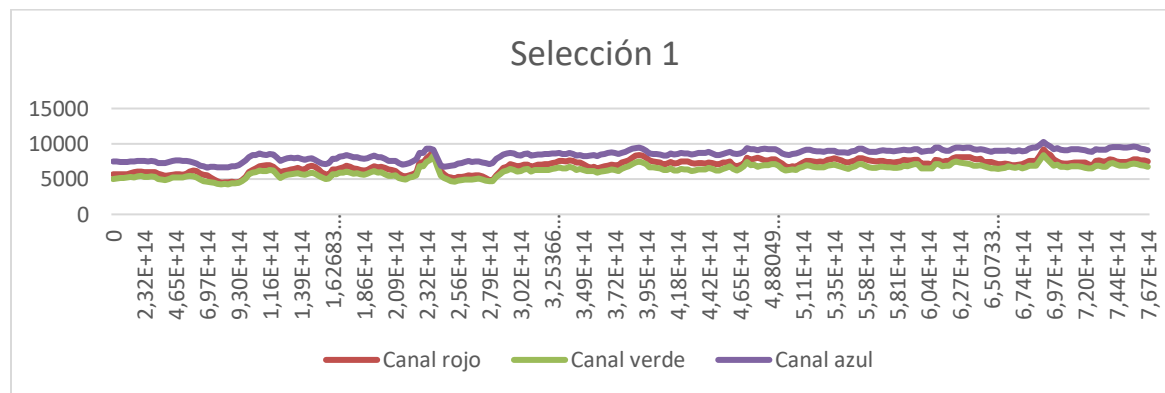
Las flechas rojas representan las áreas seleccionadas para realizar los análisis de luminiscencia. Comenzado desde la esquina superior derecha, y en sentido contrario a las manecillas del reloj, se tienen las selecciones 1 (flecha más larga), 2 (flecha mediana) y 3 (flecha más corta).



Para la primera selección, el programa determinó 298 puntos (en micras), con un índice de luminiscencia de tres canales (verde, azul y rojo) para cada uno de esos puntos. La graficación de estos puntos no muestra una relación clara entre las regiones donde se identificó o no expresión del gen (*Hes1*), y no permite realizar una cuantificación o comparación entre expresión vs no expresión del gen (gráfica 5-15). De igual manera, se realizó una prueba ANOVA de una vía, con un p valor de 0.926 para el canal rojo, 0.984 para el canal verde, y 0.997 para el canal azul. Como los resultados son mayores al valor de significancia, no se pueden determinar diferencias significativas a lo largo del recorrido, no es posible realizar una prueba *pos hoc*, y no se puede determinar una diferencia entre los canales y las regiones. Posteriormente, se realizó comparación de las medias de cada canal para las regiones HL y NI (tabla 5-2) donde se encuentra una diferencia promedio entre las regiones. Seguido, se realizó una correlación de Pearson entre los valores de las regiones HL con la región NI, y se obtuvo para el canal rojo un valor de -0,089 con un $p=0,673$, para el canal verde un valor de -0,380 con un $p=0,67$, y para el canal azul un valor de -0.237 y $p=0,265$. De acuerdo con lo anterior, por tanto, hay diferencia entre la luminiscencia de donde se describe la expresión del gen *Hes1* respecto a donde no hay expresión.

Gráfica 5-15: Comparación de los valores de luminiscencia en regiones de expresión – no expresión en micras, para la primera selección en corte HH34 del gen *Hes1*.

Para cada uno de los 298 puntos tomados automáticamente de acuerdo con la selección realizada en el programa Zeiss Zen Pro 2011, se comparó el resultado de salida de los tres canales de color (rojo, verde, azul) a través de ANOVA, no hay significancia en la diferencia entre los canales ($\text{sig.} > 0.92$), y de acuerdo con la gráfica, aunque se pueden ver las regiones con expresión (a la izquierda de $1,64\text{E}+14$ micras). Posteriormente, al comparar las regiones HL y NI, se encuentra diferencia en la luminiscencia con una correlación de Pearson de $-0,089$ y $p=0,673$.



Gráfica 5-16: Comparación de los valores de luminiscencia en regiones de expresión – no expresión en micras, para la segunda selección en corte HH34 del gen *Hes1*.

Para cada uno de los 117 puntos tomados automáticamente de acuerdo con la selección realizada en el programa Zeiss Zen Pro 2011, se comparó el resultado de salida de los tres canales de color (rojo, verde, azul). De acuerdo con la gráfica, no es posible comparar la región PV con la región LPO.

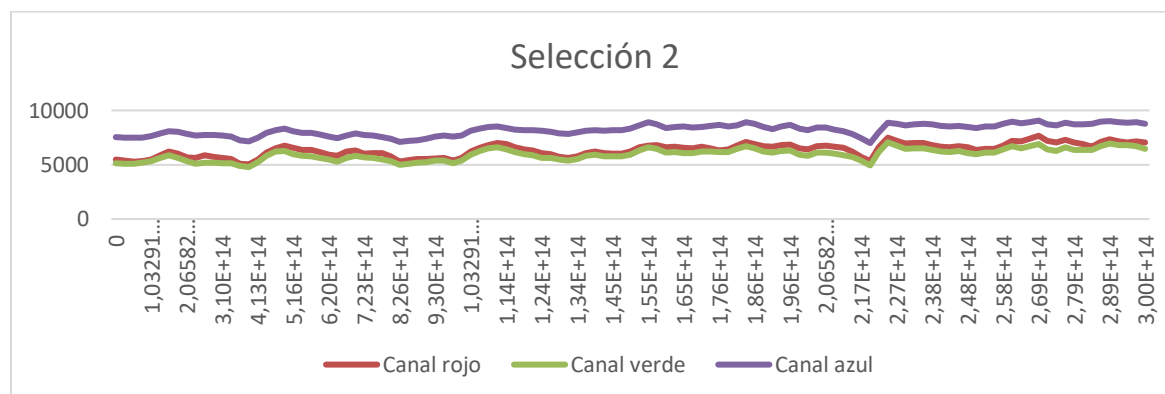


Tabla 5-2: Relación del valor bruto de luminiscencia de la sección 1.

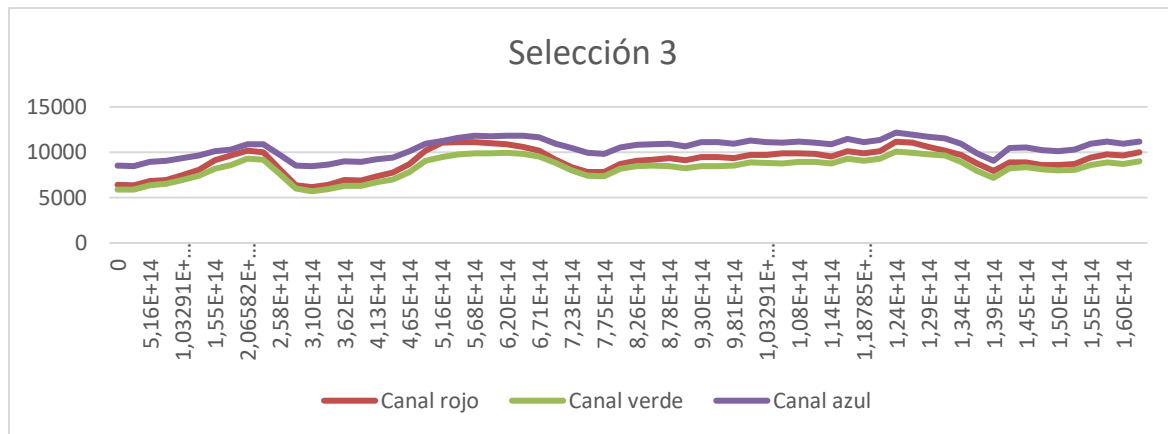
Comparación del valor de cada uno de los distintos canales respecto a las áreas que conforman las dos regiones comparadas de expresión y no expresión del gen *Hes1*. Los valores más altos se encuentran en la región NL que no tiene expresión de dicho gen.

Región HL (expresión Hes1)				Región NL (no expresión Hes1)			
Distancia en micras	Canal rojo	Canal verde	Canal azul	Distancia en micras	Canal rojo	Canal verde	Canal azul
0	5683	5020	7518	7,05E+14	7225	6723	9088
2,58E+14	5714	5076	7500	7,08E+14	7171	6679	9116
5,16E+14	5665	5124	7422	7,10125E+13	7296	6843	9234
7,75E+14	5660	5162	7413	7,13E+14	7340	6822	9223
1,03291E+13	5675	5240	7426	7,15E+14	7381	6840	9244
1,29E+14	5854	5310	7492	7,18E+14	7364	6727	9165
1,55E+14	5979	5246	7480	7,20E+14	7339	6615	9051
1,81E+14	6036	5378	7549	7,23E+14	7100	6534	8940
2,06582E+13	6079	5463	7578	7,26E+14	6905	6513	8862
2,32E+14	6005	5334	7534	7,28E+14	7589	6920	9201
2,58E+14	6012	5295	7521	7,31E+14	7639	6904	9196
2,84E+14	6019	5353	7558	7,33E+14	7523	6767	9131
3,10E+14	5953	5302	7500	7,36E+14	7514	6710	9121
3,36E+14	5739	5006	7257	7,39E+14	7785	7166	9461
3,62E+14	5591	4924	7254	7,41E+14	7711	7242	9554
3,87E+14	5457	4858	7247	7,44E+14	7519	7039	9520
4,13E+14	5548	4995	7426	7,46E+14	7423	6885	9519
4,39E+14	5638	5196	7598	7,49E+14	7425	6904	9460
4,65E+14	5688	5233	7622	7,51E+14	7425	6904	9460
4,91E+14	5650	5211	7628	7,54024E+13	7583	7091	9555
5,16E+14	5632	5265	7535	7,57E+14	7791	7183	9592
5,42E+14	5767	5403	7590	7,59E+14	7782	7086	9509
5,68E+14	6025	5427	7501	7,62E+14	7651	6930	9333
5,94E+14	6229	5386	7349	7,64E+14	7654	6910	9251
				7,67E+14	7509	6731	9091
Media	5804,083333	5216,958333	7479,083333	Media	7,47E+03	6,87E+03	9,28E+03
Desviación	203,7464146	165,6532468	111,2990162	Desviación	222,0473448	193,9204132	208,0388425

El proceso se repitió con las secciones 2 (117 puntos, gráfica 5-16) y 3 (64 puntos, gráfica 5-17). En la sección dos, el resultado de la ANOVA para los canales fue de 0.719 para el canal rojo, 0,822 para el verde y 0,566 para el azul. En la sección 3, los resultados del ANOVA fueron para el canal rojo de 0.815, en el canal verde de 0.759, y en el azul de 0,744.

Gráfica 5-17: Comparación de los valores de luminiscencia en regiones de expresión – no expresión en micras, para la tercera selección en corte HH34 del gen *Hes1*.

Para cada uno de los 64 puntos tomados automáticamente de acuerdo con la selección realizada en el programa Zeiss Zen Pro 2011, se comparó el resultado de salida de los tres canales de color (rojo, verde, azul). Respecto a la gráfica, no es posible comparar la corteza de la región VL del hipocampo con la región VM adyacente que no hace parte del hipocampo de pollo.



Debido a que, al realizar la comparación entre distintas áreas varios cortes de los cuatro estadios y dos genes, se obtenían resultados similares a los expuestos, se decidió no seguir el proceso, en cuanto no permite: 1) realizar una comparación efectiva entre regiones donde se ve la expresión de los genes *Notch1* y *Hes1*, sobre todo aquellas donde se ve claramente las neuronas a 100x y 200x; 2) realizar una cuantificación de la expresión del gen en dichas regiones.

Migración radial y tangencial

Aunque no era parte de los objetivos de estudio de la presente investigación, en varios de los cortes del gen *Hes1* (Figuras 5-18 a 5-24) en los estadios HH38 y HH40 se pudo observar los dos tipos de migración neuronal expuestos previamente (radial y tangencial), dando cuenta de mecanismos extrínsecos e intrínsecos en la organización neuronal, en este caso, desde los ventrículos laterales hasta la organización del hipocampo y sus cortezas dorsomediales. De acuerdo con Hoffman (2009), no se puede afirmar una preferencia de un mecanismo sobre otro, sino la presencia de los dos tipos de organización neuronal en los cortes efectuados.

Figura 5-18: Corte para el gen *Hes1* en estadio HH38 sobre corte de 8µm de la zona VM a 200x.

A) Las flechas negras indican expresión del gen *Hes1*, en la corteza ventromedial en la región de hipocampo de pollo. Se puede observar la organización tangencial de las células. B) Representación esquemática. En Azul, las células con expresión del gen *Hes1* que muestran el tipo de organización descrita.

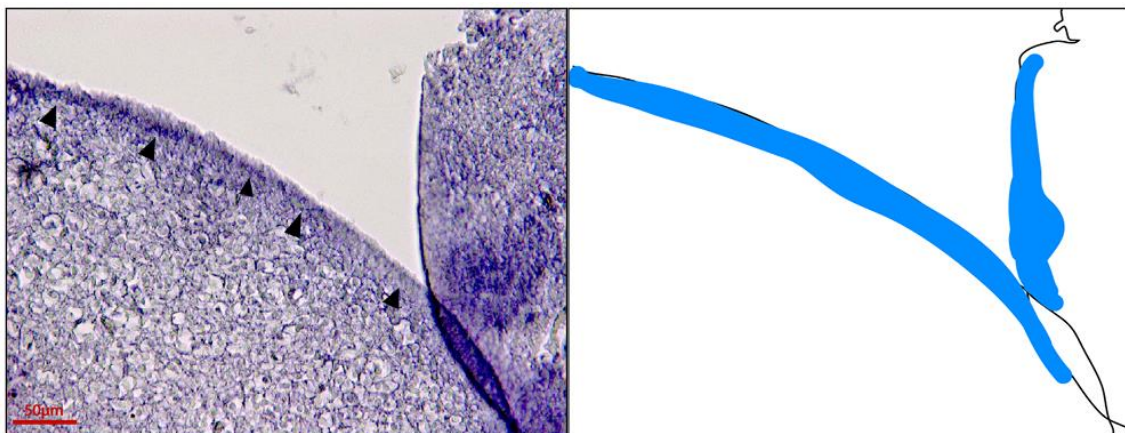


Figura 5-19: Corte para el gen *Hes1* en estadio HH38 sobre corte de 8µm de la zona VL a 200x.

A) Las flechas negras indican expresión del gen *Hes1*, en la corteza ventrolateral en la región de hipocampo de pollo. Se puede observar la organización en columnas radiales de las células. B) Representación esquemática. En Azul, las células con expresión del gen *Hes1* que muestran el tipo de organización descrita.

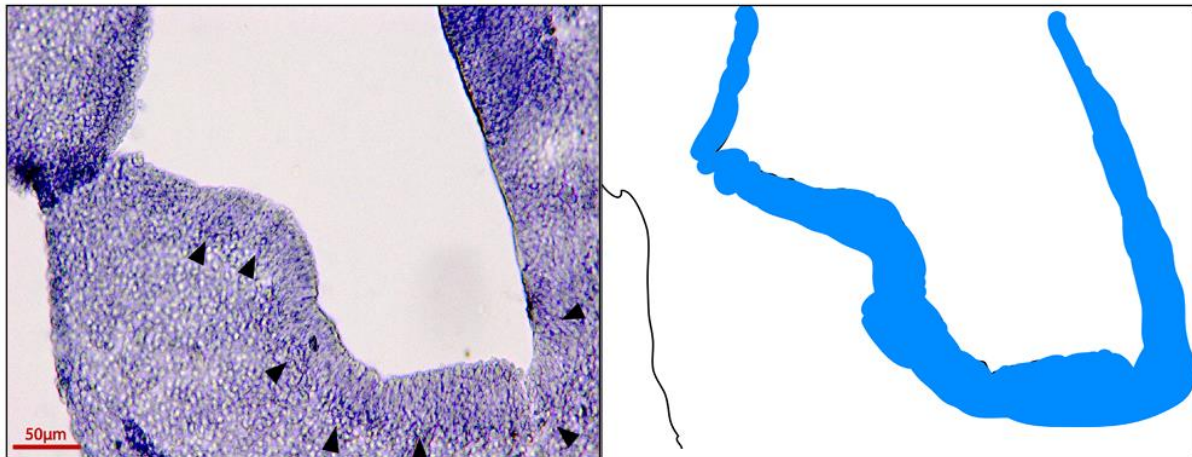


Figura 5-20: Corte para el gen *Hes1* en estadio HH38 sobre corte de 8µm de la zona VM a 200x.

A) Las flechas negras indican expresión del gen *Hes1*, en la corteza ventromedial en la región de hipocampo de pollo. Se puede observar la organización en columnas radiales de las células. B) Representación esquemática. En Azul, las células con expresión del gen *Hes1* que muestran el tipo de organización descrita.

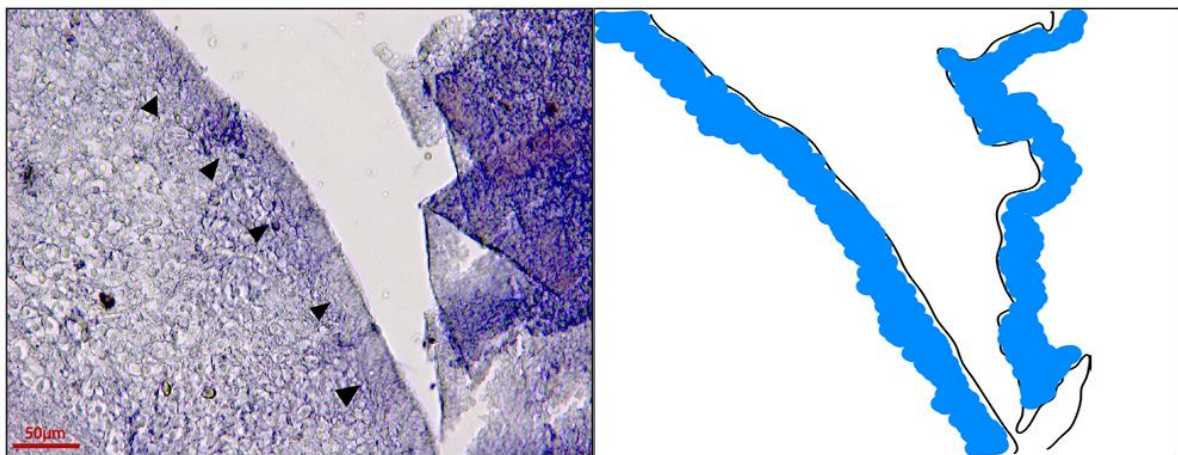


Figura 5-21: Corte para el gen *Hes1* en estadio HH38 sobre corte de 8µm de la zona VL a 200x.

A) Las flechas negras indican expresión del gen *Hes1*, en la corteza ventrolateral bilateral en la región de hipocampo de pollo. Se puede observar la organización en columnas radiales de las células. B) Representación esquemática. En Azul, las células con expresión del gen *Hes1* que muestran el tipo de organización descrita.

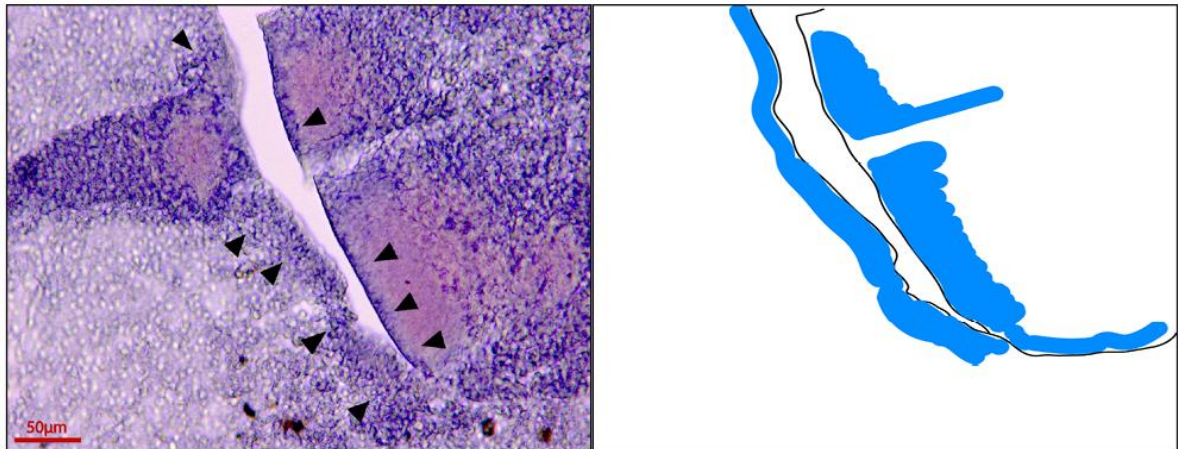


Figura 5-22: Corte para el gen *Hes1* en estadio HH40 sobre corte de 8µm de la zona VM a 200x.

A) Las flechas negras indican expresión del gen *Hes1*, en la corteza ventromedial ventricular. Se puede observar la migración tangencial en esta zona. B) Representación esquemática. En Azul, las células con expresión del gen *Hes1* que muestran el tipo de organización descrita.

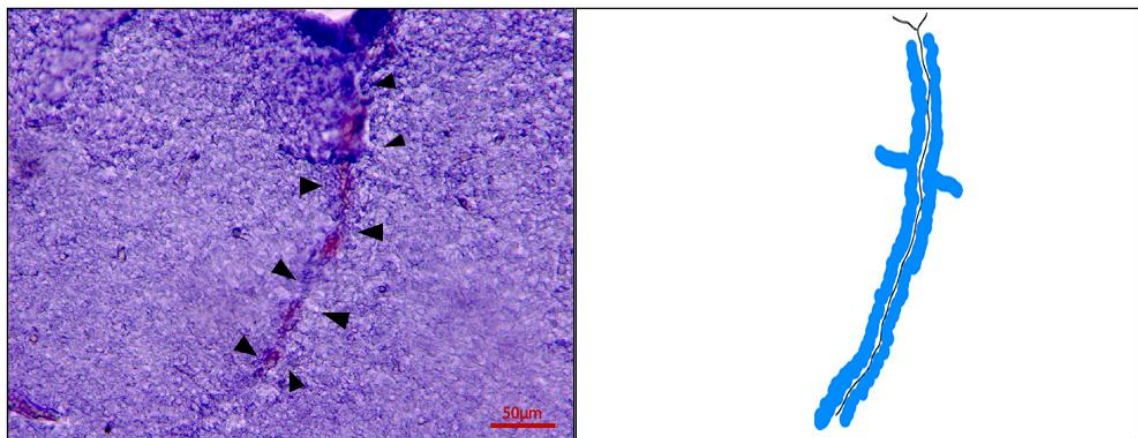


Figura 5-23: Corte para el gen *Hes1* en estadio HH40 sobre corte de 8µm de la zona VM a 200x.

A) Las flechas negras indican expresión del gen *Hes1*, en la corteza ventromedial ventricular. Se puede observar la migración tangencial en esta zona. B) Representación esquemática. En Azul, las células con expresión del gen *Hes1* que muestran el tipo de organización descrita.

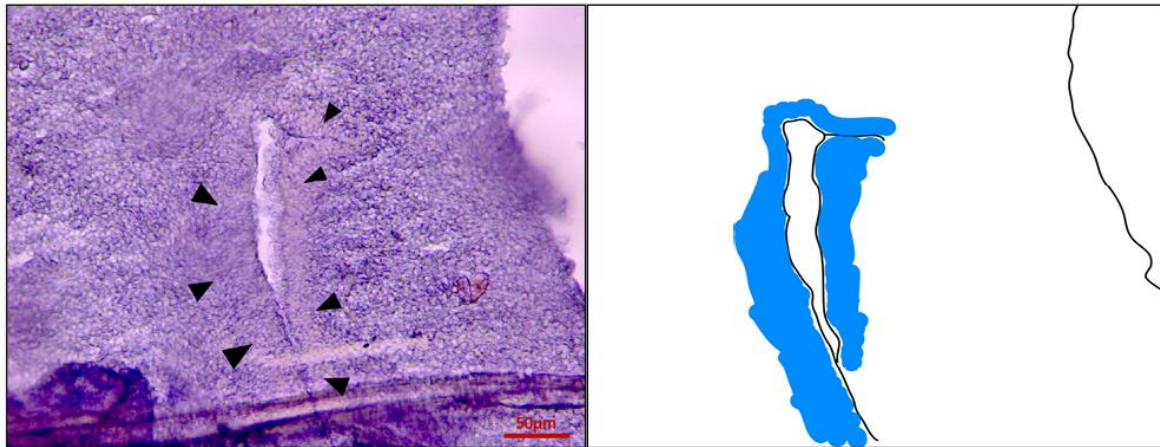
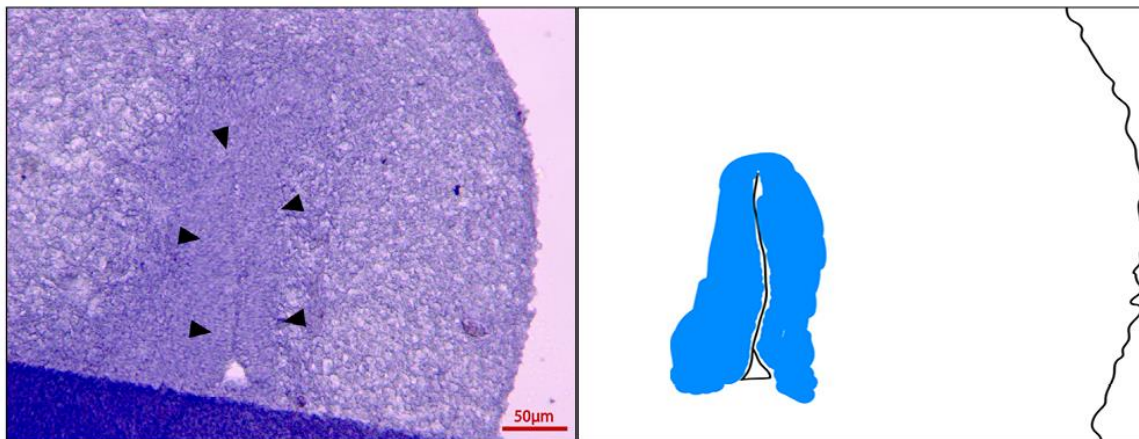


Figura 5-24: Corte para el gen *Hes1* en estadio HH40 sobre corte de 8µm de la zona VM a 200x.

A) Las flechas negras indican expresión del gen *Hes1*, en la corteza ventromedial ventricular. Se puede observar la migración tangencial en esta zona. B) Representación esquemática. En Azul, las células con expresión del gen *Hes1* que muestran el tipo de organización descrita.



De esta manera, fue posible apreciar en el presente estudio, en los cortes del gen *Hes1*, lo descrito por Rakic (1989; 2009) en cuanto a la organización celular en el neurodesarrollo del encéfalo. De igual manera, se puede apreciar el postulado de Hoffman (2009) de la presencia de los dos tipos de migración planteados, y la forma en que se ordenan las

neuronas en las regiones de interés, de acuerdo con Gupta et al (2012). Dado que no se planeó estudiar dicho proceso, es interesante plantear la manera en qué los componentes de la vía Notch podrían estar involucrados en este proceso, teniendo en cuenta que dicha organización no se pudo observar en el estadio HH40 del gen *Notch1*.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

1. Hay expresión de gen *Notch1* en los estadios HH34 y HH36 en la región correspondiente al Hipocampo embrionario del pollo.
2. Hay expresión también en los estadios HH34 y HH36 en otras regiones del embrión del pollo (DM, DL, DM, así como la formación de la región VL de la zona ventral en forma de V, sino en otras áreas del cerebro de pollo como TSM, VL, LMD, PA, Ald.).
3. Teniendo en cuenta la función atribuida al gen *Notch1*, posiblemente su función en las etapas HH34 y HH36, se relaciona con procesos de diferenciación celular en estos períodos.
4. La expresión del gen *Notch1* no se identifica en los estadios HH38 y HH40.
5. Es necesario confirmar si hay expresión de genes de la vía Notch en modelo de pollo en estadios más tempranos (HH26 a HH32).
6. Hay expresión de gen *Hes1* en los estadios HH34 y HH40 en la región correspondiente al Hipocampo embrionario del pollo.
7. Hay expresión de este mismo gen en el cierre de los ventrículos laterales (Figuras 5-16 a 5-24).
8. Las células (posibles precursores neuronales) se organizan en forma de unidades radiales en dichas zonas
9. No se encuentra expresión de este gen en otras regiones del cerebro de pollo.
10. La expresión de los genes *Notch1* y *Hes1* se presenta de manera diferente para cada gen, es decir, no se da de la misma manera en todos los estadios y regiones. Por tal motivo, es necesario explorar los demás componentes de la vía de señalización Notch.

6.2 Recomendaciones

Los resultados obtenidos sugieren la participación de los genes de la vía de señalización Notch: *Notch1* y *Hes1* durante el neurodesarrollo del homólogo del hipocampo en pollo. De lo anterior, se plantean las siguientes recomendaciones:

- Determinar, mediante la técnica de hibridación *in situ*, los patrones de expresión de los otros componentes de la vía de señalización Notch (*Notch2*, *Hes2*, *Serrate 1 / 2*) en los estadios estudiados HH 34 a HH40.
- Determinar los patrones de expresión de todos los componentes de la vía durante los estadios HH26 a HH32.
- Evaluar la correlación entre patrones de genes componentes de la vía Notch y marcadores de diferenciación neuronal
- Realizar estudios de ganancia y pérdida de función e identidad de *Notch1* en los estadios HH34 a HH40.
- Evaluar la posible participación de mecanismos epigenéticos como metilación y desmetilación en la regulación transcripcional del gen *Notch1*, en el desarrollo del hipocampo de pollo.

A. Anexo: Estadios de desarrollo de Hamilton y Hamburger

Tabla 6-1: Descripción de los estadios HH

Estadios HH	Edad	Identificación del estadio
1		"capa embrionaria" por acumulación de células en la mitad posterior del blastodermo.
2	6-7 h	Etapas transitorias en la que se observa la línea primitiva corta (0,3-0,5 mm)
3	12-13 h	La línea primitiva se extiende del extremo posterior hacia el centro del área pelúcida.
4	18-19 h	Aparece el surco primitivo, el nódulo de Hensen.
5	19-22 h	La formación de la notocorda es visible como una extensión de células condensadas del mesodermo por delante del nódulo de Hensen.
6	23-25 h	El pliegue definitivo del blastodermo anterior a la notocorda ahora marca el extremo anterior del embrión.
7	23-26 h	Los pliegues neurales son visibles en la región de la cabeza.
8	26-29 h	Los pliegues neurales llegan al cerebro medio. Se forman islas de sangre en la mitad posterior del blastodermo.
9	29-33 h	Las vesículas ópticas primarias aparecen. Los primordios del corazón empiezan a unirse en pares.
10	33-38 h	Aparecen indicaciones del cráneo. Son visibles tres vesículas primarias del cerebro y el corazón se desplaza a la derecha.
11	40-45 h	Se distinguen cinco neuromeros cerebrales. El neuróporo anterior empieza a cerrarse. El corazón queda completamente a la derecha.
12	45-49 h	La cabeza se desplaza al lado izquierdo. Se diferencia el telencéfalo. Las vesículas ópticas y el tallo óptico se establecen.
13	48-52 h	Las curvaturas craneales y cervicales son evidentes y se agranda el telencéfalo. El pliegue cefálico del anión cubre la región anterior, media y posterior.
14	50-53 h	Somitas

15	50-55 h	se forman más somitas y empiezan a formarse las yemas que darán origen a las extremidades y la cola
16	51-56 h	El cuerpo lateral se pliega a nivel de las somitas 17-20, entre alas y patas
17	52-64 h	El cuerpo lateral se pliega a través de la circunferencia entera del cuerpo
18	65-69 h	
19	68-72 h	
20	70-72 h	
21	3.5 d	
22	3.5 d	Pigmentación en el ojo. Las somitas se extienden a la cola.
23	4 d	Los brotes de alas y piernas son igual de anchos y largos
24	4.5 d	Los brotes de alas y piernas son más largos que anchos. El primer dedo del pie brota de forma distinta
25	4.5-5 d	Codos y rodillas distintos. Plancha del ala es distinta pro sin demarcación.
26	5 d	Aumento sensible del tamaño del embrión, el embrión tiene forma de C: la cabeza se mueve más cerca de la cola. Extensión de las extremidades. Diferenciación de los dedos de las extremidades inferiores
27	5-5.5 d	
28	5.5-6 d	
29	6-6.5 d	La membrana vitelina sigue creciendo y ahora rodea a más de la mitad de la yema. Fisura entre los dedos primero, segundo y tercero de las extremidades superiores, y entre el segundo y tercer dedo de las extremidades inferiores.
30	6.5-7 d	
31	7-7.5 d	Adelgazamiento del cuello, que ahora separa claramente la cabeza del cuerpo. Formación del pico. El cerebro entra progresivamente en la región cefálica: progresivamente se hace más pequeño en proporción al tamaño del embrión.
32	7.5 d	
33	7.5-8 d	
34	8 d	La membrana vitelina cubre casi toda la yema. La pigmentación de los ojos es fácilmente visible. Se pueden diferenciar la parte superior e inferior del pico, así como las alas y las piernas. El cuello se estira y el cerebro está completamente ubicado en su cavidad.
35	8-9 d	Aparecen las garras. Brote de los primeros folículos de las plumas. Crecimiento de la alantoides y aumento de la vascularización del vitelo

36	10 d	Las fosas nasales están presentes como aberturas estrechas. Crecimiento de los párpados. Extensión de la porción distal de las extremidades. La membrana vitelina rodea completamente la yema.
37	11 d	La fisura palpebral es de forma elíptica que tiende a ser más delgada. La alantoides alcanza su tamaño máximo, mientras que el vitelo comienza a achicarse. El embrión tiene ahora el aspecto de un pollo.
38	12 d	Los folículos de las plumas rodean el meato auditivo externo y cubren el párpado superior. El párpado inferior cubre dos terceras partes, o incluso tres cuartos de la córnea.
39	13 d	La alantoides se encoge para convertirse en la membrana corioalantoidea. Aparecen las escamas de las garras y de las piernas.
40	14 d	La pelusa cubre casi todo el cuerpo y crece rápidamente.
41	15 d	Pocos cambios morfológicos: el pollo y las plumas siguen creciendo. Se acelera la reducción del vitelo. Desaparición progresiva de la clara de huevo. La cabeza se mueve hacia la posición de picado, bajo el ala derecha
42	16 d	
43	17 d	El sistema renal del embrión produce uratos. El pico, que está bajo el ala derecha apunta hacia la celda de aire. La clara de huevo se reabsorbe totalmente.
44	18 d	Inicio de la internalización de vitelo. Reducción de la cantidad de líquido amniótico. Este es el momento para la transferencia de la incubadora a la nacedora, y quizás también de la vacunación in ovo.
45	19-20 d	Se acelera la resorción del vitelo. El pico está contra la membrana de la cáscara interior, listo para perforarla. El vitelo está totalmente reabsorbido, se cierra el ombligo.
46	21 d	El pollo usa sus alas como guía y sus piernas para darse la vuelta y perforar la cáscara en forma circular a través de su diente-huevo

B. Anexo: Protocolo para la preparación de soluciones

Agua DEPC 0.1% (1000 ml)

1. A 1000 ml de Agua Milli-Q se le agrega 1 ml de solución DEPC puro.
2. Agitar en plancha por 10 a 20 minutos.
3. Dejar entre 1 y 12 horas en incubadora a 37°C. La botella debe quedar bien tapada.
4. Esterilizar la botella con el líquido en autoclave de 15 a 30 minutos para eliminar rastros de DEPC.
5. Almacenar a 4°C hasta el momento que se vaya a utilizar.

PBS / DEPC 1X (1000 ml)

1. Mezclar:

8 gr	NaCl
0.2 gr	KCL
1.44 gr	Na ₂ HPO ₄
0.244 gr	KH ₂ PO ₄
2. Completar hasta 1000 ml de Agua DEPC.
3. Agitar en plancha por 10 a 20 minutos.
4. Ajustar el pH a 7.4 en pH-metro con NaOH o HCl, según el caso.
5. Almacenar a 4°C hasta el momento que se vaya a utilizar.

PBT (1000 ml)

1. A 1000 ml de PBS, agregar 1 ml de Tween 20 0.1%.
2. Agitar en plancha por 5 a 10 minutos.
3. Almacenar a 4°C hasta el momento que se vaya a utilizar.

Paraformaldehído (PFA) 4%

1. En cabina de extracción, calentar en plancha a 70°C 80 ml de PBS y adicionar 8 gr de PFA en polvo.
2. Completar 100 ml con PBS para dejar PFA al 8% (2X).
3. Agitar por 2 a 3 horas, hasta que el líquido sea transparente
4. Alicuotar en dos Falcon de 50 ml y almacenar a -20°C.
5. Cuando se va a usar, diluir en el doble del volumen para llevarlo al 4%.

C. Anexo: Protocolo para la preparación de soluciones

Proteinasa K (10 mg/ml)

1. En un Falcon de 50 ml se agregan 40 ml de PBT
2. Agregar 0.40 µl de Proteinasa K 1mg/1ml

Triethanolamina 0.1 M (200 ml)

1. En un frasco de vidrio agregar 2.64 ml de Triethanolamida 100X.
2. Completar 200 ml con agua DEPC.

Solución de bloqueo (10 ml stock)

1. En un Falcon agregar:

2 ml	sheep serum
10 mg	BSA (albumina)
2. Completar el volumen con 8 ml de PBT.

Solución de bloqueo (5 ml anti-dig)

1. En 5 ml de solución de bloqueo, agregar 1 µl de anti-dig

Chaps 10% (10 ml)

1. A 0.61488 mg de Chaps, agregar 10 ml de agua DEPC.

Solución de hibridación (50 ml)

1. En un Falcon de 50 ml, agregue:

25 ml	Formamida
3.25 ml	SSC 20X
0.5 ml	EDTA 5nM

- | | |
|--------|------------------|
| 2.5 mg | RNA levadura |
| 100 µl | Tween 20 al 10% |
| 2.5 ml | Chaps 10% |
| 100 µl | Heparina 50mg/ml |
2. Completar con 18.4 ml de agua DEPC
 3. Envolver de forma que no le dé luz.
 4. Almacenar a -20°C

Sonda (1:100)

1. Agregue 1 µl de sonda en 100 µl de solución de hibridación

Solución SSC 20X (100 ml)

1. A 80 ml de agua DEPC agregar:
17.53gr NaCl
8.82gr Na₃ citrato (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O)
2. Mezclar con magneto y calor.
3. Completar a 100ml con agua DEPC.
4. Ajustar el pH a 5.3 con ácido cítrico.

Solución SSC 2X con Chaps 0.1 (200 ml)

1. Diluir el SSC 20X a 2X
2. A 200 ml de SSC 2X agregar 20 mg de Chaps

Solución Tris HCl 1M

1. En un frasco de vidrio agregar 39.4 gr de Tris HCl.
2. Agregar 300 ml de agua DEPC hasta completar el volumen.

PBT con Levamisol 1u (500 ml)

1. A 500 ml de PBT agregar 120 mg de Levamisol.
2. Agitar y usar en el procedimiento del día.

Tween 20 al 10% (10 ml)

1. En un Falcon de 15 ml, agregue 1 ml de Tween 20.
2. Agregue 9 ml de agua Milli-Q.

3. Agite por 1 minuto.
4. Almacenar a 4°C.

NTMT (50 ml)

1. En Falcon de 50 ml agregar
 - NaCl 1M 5 ml
 - Tris HCl 1M 5 ml
 - MgCl 5M 500 µl
 - Tween 20 10% 50 µl
2. Completar el volumen con 39 ml de agua Milli-Q.

Solución de revelado NTMT + NBT/ BCIP (10 ml)

1. En un falcon, protegido de la luz, agregar 10 ml de NTMT.
2. Adicionar agregar 113 µl de NBT/ BCIP.
3. Usar inmediatamente.

Medio de montaje de láminas glicerol 70% (10 ml)

1. En un Falcon de 10 ml, agregue 70 ml de glicerol.
2. Adicione 30 ml de PBT.
3. Revolver por 30 segundos.

D. Anexo: Protocolo de manejo y fijación de embriones de pollo

Agua DEPC 0.1% (1000 ml)

1. A 1000 ml de Agua Milli-Q se le agrega 1 ml de solución DEPC puro.
2. Agitar en plancha por 10 a 20 minutos.
3. Dejar entre 1 y 12 horas en incubadora a 37°C. La botella debe quedar bien tapada.
4. Esterilizar la botella con el líquido en autoclave de 15 a 30 minutos para eliminar rastros de DEPC.
5. Almacenar a 4°C hasta el momento que se vaya a utilizar.

PBS / DEPC 1X (1000 ml)

1. Mezclar:
8 gr NaCl
0.2 gr KCL
1.44 gr Na₂HPO₄
0.244 gr KH₂PO₄
2. Completar hasta 1000 ml de Agua DEPC.
3. Agitar en plancha por 10 a 20 minutos.
4. Ajustar el pH a 7.4 en pH-metro con NaOH o HCl, según el caso.
5. Almacenar a 4°C hasta el momento que se vaya a utilizar.

PBT (1000 ml)

1. A 1000 ml de PBS, agregar 1 ml de Tween 20 0.1%.
2. Agitar en plancha por 5 a 10 minutos.
3. Almacenar a 4°C hasta el momento que se vaya a utilizar.

Se incubaron huevos fértiles de la especie *Gallus gallus* a una temperatura entre 37.2 y 37.5°C con una humedad promedio de 66%, y se obtuvieron embriones en estadios HH34, HH36, HH38 y HH40. La clasificación de los estadios se realizó basados en los criterios de Hamburger y Hamilton y utilizando las descripciones anatómicas mostradas por Bellairs y Osmond (2005). Los embriones son disecados de las membranas extraembrionarias en solución PBS, fijados en paraformaldehído al 4% (PFA) y luego se deshidratan, para luego dar inicio al protocolo de inclusión y embebido en parafina.

Protocolo:

1. Eliminar las membranas extra embrionarias y todo el material orgánico que pueda interferir con los procedimientos posteriores con pinzas de disección mientras se encuentra sumergido en PBS a 4°C.
2. Los embriones se fijan en PFA 4% a 4 °C por un tiempo de 16 horas.

El PBS y el PFA es preparado previamente con Agua DEPC (Anexo B) para evitar la degradación del RNA hístico por enzimas RNAasas.

E. Anexo: Protocolo de inclusión y embebido en parafina, y cortes histológicos de embrión de pollo

1. Una vez transcurridas las 16 horas, a la mañana siguiente de la fijación de los embriones de pollo (Anexo D), realizar 2 lavados con PBS cada uno de 5 minutos.
2. Deshidratar en series continuas de etanol en PBT:
 - 2 lavados en etanol al 50% por 15 minutos cada lavado
 - 2 lavados en etanol al 70% por 15 minutos cada lavado
 - 1 lavado en etanol al 80% por 30 minutos
 - 1 lavado en etanol al 90% por 30 minutos
 - 2 lavado en etanol 100% por 30 minutos cada uno
3. Realizar dos lavados en xilol por 10 minutos cada lavado.
4. Hacer inclusión en xilol – parafina (1:1) durante 1 hora a 58°C, preferiblemente con vacío.
5. Realizar 3 lavados en parafina líquida a 58°C, preferiblemente con vacío, por 15 minutos cada lavado.
6. Incluir en parafina líquida limpia a 58°C, preferiblemente con vacío, por mínimo 24 horas.
7. Embeber en bloques hechos con moldes de papel aluminio.
8. Dejar enfriar por 10 a 15 minutos cada bloque.
9. Llevar los bloques de parafina a 4°C por 24 horas.
10. Almacenar a temperatura ambiente resguardado de la luz directa, hasta por 6 meses.
11. Para realizar los cortes, retirar el envoltorio de aluminio de los bloques y unirlos a un cassette del micrótopo.
12. Realizar cortes coronales a 8 µm.

13. Las tiras obtenidas con los cortes histológicos, ubicarlas sobre láminas SuperFrost®. Otro tipo de lámina no sirve para el procedimiento.
14. Sumergir las láminas en agua DEPC a 45°C por 10 a 15 segundos, para que los tejidos se estiren y se adhieran a la superficie de la lámina.
15. Secar entre 1 y 2 horas en plancha a 40°C, cubiertas con aluminio para evitar contaminación.
16. Almacenar a -20°C por máximo 5 días, antes de realizar el procedimiento de hibridación *in situ* (Anexo F)

F. Anexo: Protocolo de hibridación *in situ* sobre cortes histológicos de embrión de pollo

Día 1

1. Retirar las láminas de -20°C. Desparafinar placas durante 30 minutos en el horno a 60°C.
2. Lavar 2 veces en xilol por 10 minutos cada uno.
3. Lavar en etanol 100% por 2 minutos
4. Hidratación de las láminas en series de etanol en PBT 100%, 95%, 70% y 50% por un minuto cada lavado.
5. Un lavado en PBS por 5 minutos
6. Fijación en PFA 4% durante 20 minutos
7. Dos lavados en PBS de 5 minutos
8. Incubación en proteinasa K (10µg/ml PBS) precalentada a 37°C a temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. Dos lavados en PBS/DEPC durante 1 minuto.
10. Fijación en PFA 4% por 20 minutos
11. Lavado en DEPC 0.1 M trietanolamina (200 ml) con anhidro acético por 10 minutos. Se agrega directamente sobre las placas 500µl de anhidro acético, debe ser rápido a temperatura ambiente.
12. Lavado en PBS por 5 minutos
13. Deshidratación en series de etanol en PBT de 30%, 50%, 70%, 80%, 90 y 100%.
14. Secado de las placas por 2 horas, cubriéndolas
15. Agregar sonda a 60°C
16. Dejar las láminas cubiertas individualmente con acetato para que la sonda no se evapore. Dejar a 60°C por 16 horas.

Día 2

1. Sumergir las láminas en SSC 2X con CHAPS 0,1% precalentado a 37°C por 30 minutos.
2. Agregar al lavado de SSC 2X, 1µg/ml de RNasa a 37°C por 30 minutos
3. Enjuagar dos veces con SSC 2X limpio (sin Chaps) a temperatura ambiente
4. Lavar con SSC 2X con Chaps 0.1% precalentado a 65°C 3 veces, 20 minutos por cada lavado
5. Lavar con SSC 0.2X con Chaps 0.1% precalentado a 65°C 3 veces, 20 minutos por cada lavado
6. Lavar con PBT a temperatura ambiente por 10 minutos dos veces
7. Prebloquear con suero de cabra 20% en PBT por 2-3 horas a temperatura ambiente
8. Incube en Anticuerpo a una dilución de 1:5000 en suero 20% en PBT por toda la noche, a 4°C

Día 3

1. Lave 6 veces con PBT que contenga levamisole 1 mM a temperatura ambiente por 30 minutos cada lavado.
2. Lave 2 veces con NTMT por 15 minutos cada lavado
3. Adicionar solución reveladora NTMT + NBT/ BCIP en completa oscuridad a temperatura ambiente.
4. Dejar actuar mínimo 2 horas. A partir de entonces, revisar la señal cada 30 minutos.
5. Una vez haya señal (tiempo promedio 4 horas y media posteriores a la adición del revelador), lavar con PBT por 5 minutos.
6. Fijar las láminas en PFA 4% por 20 minutos
7. Enjuagar con PBT.
8. Dejar secar las láminas por 10 minutos
9. Montar las láminas: adicionar 20 µl de medio de montaje glicerol 70%, cubrir con laminilla y sellar con esmalte transparente.
10. Dejar secar por 1 a 2 días, a temperatura ambiente, de forma que las láminas estén cubiertas en completa oscuridad sin ninguna exposición a la luz solar

Paso final

1. Limpiar las láminas de cualquier exceso que haya quedado de glicerol
2. Almacenar a temperatura ambiente protegida de toda luz.

G. Anexo: Consideraciones éticas

Consideraciones ético-legales e impacto ambiental

La práctica con el modelo animal pollo (*Gallus gallus*) será guiada por International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) ("CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals," 1985), por la ley 84 de 1989, por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia, según el capítulo V acerca del sacrificio de animales (Congreso, 1989) y por el principio de las tres R: Reemplazo, Reducción y Refinamiento (Mrad y Cardozo, 1999).

En cuanto al reemplazo, este principio sugiere como alternativa el uso de embriones de vertebrados, como el embrión de pollo, para sustituir el uso de animales vivos. Con respecto a la reducción, para utilizar el mínimo número de embriones se tendrán en cuenta los protocolos de trabajos previos (Arboleda y Hurtado, 2009) llevados a cabo en el Instituto de Genética con este modelo animal, así como un riguroso diseño experimental evaluado por el asesor estadístico para aprovechar al máximo las muestras y así conseguir los objetivos. Adicionalmente, la especie usada no tiene ningún compromiso con respecto a su peligro de extinción. Por último, en relación con el refinamiento, el uso del modelo animal de pollo, en este caso específico el embrión, supone dolor nulo o mínimo estrés (molestias menores e invasividad categoría B) por la etapa del desarrollo donde se lleva a cabo el sacrificio. Por la misma razón el único medio de sacrificio es la fijación en paraformaldehído.

Para la eliminación de los embriones que no cumplan con los requerimientos del estudio, malformados, que se hayan fijado a la cáscara, contaminados, o que no prosperaron, así como el resto de material orgánico que no va a ser examinado, se seguirá el protocolo según el documento del PGIRH (Plan de gestión integral del residuos hospitalarios) vigente en los Laboratorios de Neurociencias y Muerte Celular (1 y 2) del Instituto de Genética y aplicando las respectivas rutas de desecho de materiales clasificados como riesgo biológico.

Divulgación y propiedad intelectual

El marco en que se registrará es el acuerdo 035 del 2003, del Reglamento sobre propiedad Intelectual en la Universidad Nacional de Colombia. Los derechos de propiedad intelectual, patrimonial, y moral estarán a nombre de la Universidad Nacional de Colombia como persona jurídica dado que es una obra creada por encargo y con relación laboral. Las publicaciones ya sean escritas o divulgación oral, que se generen a partir del proceso investigativo, se harán únicamente bajo el consentimiento y aprobación del comité asesor de Maestría en Neurociencias y el comité pertinente de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional, y haciendo referencia a la línea a la que pertenece, grupo de investigación, facultad y sede.

Bibliografía

Abello G, Khatri S, Giraldez F, Alsina B. (2007). Early regionalization of the otic placode and its regulation by the Notch signaling pathway. *Mechanisms of development*, 124(7):631-45.

Atoji Y, Wild JM. (2006). Anatomy of the avian hippocampal formation. *Reviews in the neurosciences*, 17(1-2): 3-16.

Bae SK., Bessho Y, Hojo M, Kageyama R. (2000). The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation. *Development*, 127(13), 2933-2943.

Bannerman DM, Rawlins JNP, McHugh SB, Deacon RMJ, Yee BK, Bast T, Zhang WN, Pothuizen HHJ, Feldon J. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(3), 273-283.

Barton A, Fendrik AJ. (2013). Sustained vs. oscillating expressions of Ngn2, Dll1 and Hes1: a model of neural differentiation of embryonic telencephalon. *Journal of theoretical biology*, 328, 1-8.

Bayona F. (2012). Vía de señalización Notch durante el desarrollo de arcos branquiales en el embrión de pollo: estadios HH14 a HH18 (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Bellairs R, Osmond M. (2005). *Atlas of chick development*. Academic Press.

Bone RA, Bailey CS, Wiedermann G, Ferjentsik Z, Appleton PL., Murray PJ, Martoto M, Dale JK. (2014). Spatiotemporal oscillations of Notch1, Dll1 and NICD are coordinated across the mouse PSM. *Development*, 141(24), 4806-4816.

Brai E, Marathe S, Astori S, Fredj NB, Perry E, Lamy C, Scotty A, Alber, L. (2015). Notch1 regulates hippocampal plasticity through interaction with the Reelin pathway, glutamatergic transmission and CREB signaling. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9.

Bray SJ. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews Molecular cell biology*, 7(9): 678-689.

Carbonell B. (2012). Patrones de expresión de Notch1, Serrate2 y genes diana de la vía Notch en prominencias faciales de embriones de pollo (*Gallus gallus*) (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Carlson NR. (2014). Fisiología de la conducta. Madrid: Pearson Educación

Chaudhury S, Nag TC, Wadhwa S. (2008). Calbindin D-28K and parvalbumin expression in embryonic chick hippocampus is enhanced by prenatal auditory stimulation. *Brain Research*, 1191: 96–106.

Cornell RA, Eisen JS. (2002). Delta/Notch signaling promotes formation of zebrafish neural crest by repressing Neurogenin 1 function. *Development*, 129(11), 2639-2648.

Costa RM, Honjo T, Silva AJ. (2003). Learning and memory deficits in Notch mutant mice. *Current biology*, 13(15), 1348-1354.

Crews L, Mizuno H, Desplats P, Rockenstein E, Adame A, Patrick C, Winner B, Winkler J, Masliah E. (2006) . α -Synuclein Alters Notch-1 Expression and Neurogenesis in Mouse Embryonic Stem Cells and in the Hippocampus of Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 28(16):4250–4260.

Freire R, Cheng HW. (2004). Experience-dependent changes in the hippocampus of domestic chicks: a model for spatial memory. *European Journal of Neuroscience*, 20:1065–1068.

Freire R, Cheng HW, Nicol CJ. (2004). Development of spatial memory in occlusion-experienced domestic chicks. *Animal behaviour*, 67(1): 141-150.

Fiúza UM, Arias AM. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *Journal of Endocrinology*, 194(3), 459-474.

Fleming RJ. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in cell & developmental biology*, 9(6), 599-607.

Fortini ME. (2009). Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Developmental cell*, 16(5), 633-647.

D'Hooge R, De Deyn PP. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *BrainResearchReviews*, 36(1): 60-90.

Gupta S, Maury R, Saxena M, Sen J. (2012). Defining structural homology between the mammalian and avian hippocampus through conserved gene expression patterns observed in the chick embryo *Developmental Biology*, 366:125–141.

Gutiérrez D. (2014). Patrones de expresión de los genes Notch2, Delta1 y Ser1 el en desarrollo de los arcos faringeos y prominencias faciales de embriones de pollo entre los estadios HH14-HH23 (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Hamburger V, Hamilton HL. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88(1): 49–92.

Hamburger V, & Hamilton HL. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Developmental Dynamics*, 195(4), 231-272. Re impresión del original Hamburger V, & Hamilton HL. (1951).

Hayashi H, Mochii M., Kodama R, Hamada Y, Mizuno N, Eguchi G, Tachi C. (1996). Isolation of a novel chick homolog of Serrate and its coexpression with C-Notch-1 in chick development. *The International journal of developmental biology*, 40(6):1089-1096.

Haines N, Irvine KD. (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 786-797

Henke K, Buck A, Weber B, Wieser HG. (1997). Human Hippocampus Establishes Associations in Memory. *Hippocampus*, 7(3):249–256.

Huffman K. (2012). The developing, aging neocortex: how genetics and epigenetics influence early developmental patterning and age-related change. *Frontiers in genetics*, (3):Article 212.

Januschke J, Näthke I. (2014). Stem cell decisions: A twist of fate or a niche market?. *Seminars in cell & developmental biology* (34), 116-123

Kahn MC, Hough GE, Ten Eyck GR, Bingman VP. (2003) Internal connectivity of the homing pigeon (*Columba livia*) hippocampal formation: an anterograde and retrograde tracer study. *Journal of Comparative Neurology*, 459(2): 127-141.

Kageyama R, Ohtsuka T, Tomita K. (2000). The bHLH gene *Hes1* regulates differentiation of multiple cell types. *Molecules and cells*, 10(1), 1-7.

Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, Imayoshi I. (2008). Dynamic Notch signaling in neural progenitor cells and a revised view of lateral inhibition. *Nature neuroscience*, 11(11), 1247-1251.

Kageyama R, Ohtsuka T, Shimojo H, Imayoshi I. (2009). Dynamic regulation of Notch signaling in neural progenitor cells. *Current opinion in cell biology*, 21(6), 733-740.

Kageyama R. (2010). Dynamic Notch signaling in embryonic and adult neurogenesis. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 28(8), 649.

Kesner RP, Martinez JL. (Eds.). (2007). *Neurobiology of learning and memory*. Burlington: Elsevier Academic Press.

Kobayashi T, Mizuno H, Imayoshi I, Furusawa C, Shirahige K, Kageyama R. (2009). The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes & development*, 23(16), 1870-1875.

Kopan R, Ilagan MX G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, 137(2): 216-233.

Kubota T, Takae H, Miyake K. (2012). Epigenetic mechanisms and therapeutic perspectives for neurodevelopmental disorders. *Pharmaceuticals*, 5(4), 369-383.

Lasky JL, Wu H. (2005). Notch signaling, brain development, and human disease. *Pediatric research*, 57, 104R-109R.

López-Mascaraque L, de Castro F. (2004). Protocórtex frente a protomapa: una perspectiva desde el bulbo olfativo. *Revista de Neurología*, 39(2):146-155.

Marathe S, Alberi L. (2015). Notch in memories: Points to remember. *Hippocampus*, 25(7), 771-778.

Mody M, Cao Y, Cui Z, Tay KY, Shyong A, Shimizu E, Pham K, Schlitz P, Welsh D, Tsien JZ. (2001). Genome-wide gene expression profiles of the developing mouse hippocampus. *PNAS*, 98(15):8862-8867.

Moreira PML. (2014). Role of Notch signaling on the differentiation of early lymphoid progenitors cells: a view throughout the development of the embryonic chicken thymus and spleen (Doctoral dissertation, Faculdade de Ciências e Tecnologia).

Moser MB, Moser I. (1998). Functional Differentiation in the Hippocampus. *Hippocampus*, 8(6):608-619.

Neves J, Parada C, Chamizo M, Giráldez F. (2011). Jagged 1 regulates the restriction of Sox2 expression in the developing chicken inner ear: a mechanism for sensory organ specification. *Development*, 138(4):735-744.

Nikolakopoulou AM, Dermon CR, Panagis L, Pavlidis M y Stewart MG. (2006). Passive avoidance training is correlated with decreased cell proliferation in the chick hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 24:2631–2642.

O'Leary DD. (1989). Do cortical areas emerge from a protocortex? *Trends in neurosciences*, 12(10), 400-406.

O'Leary DD. (2002). Do cortical areas emerge from a protocortex. *Brain development and cognition: A reader*, 322-337.

Oya S, Yoshikawa G, Takai K, Tanaka JI., Higashiyama S, Saito N, Kirino T, Kawahara N. (2009). Attenuation of Notch signaling promotes the differentiation of neural progenitors into neurons in the hippocampal CA1 region after ischemic injury. *Neuroscience*, 158(2), 683-692.

Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N. (2011). Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron*, 69(5): 840-855.

Rakic P. (1990). Principles of neural cell migration. *Experientia*, 46(9), 882-891.

Rakic P. (1995). Radial versus tangential migration of neuronal clones in the developing cerebral cortex. *PNAS*, 92(25), 11323-11327.

Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S. (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687–699.

Resende TP, Andrade RP, Palmeirim I. (2014). Timing embryo segmentation: dynamics and regulatory mechanisms of the vertebrate segmentation clock. *BioMed research international*, 2014.

Ryan MM, Guévremont D, Luxmanan C, Abraham WC, Williams JM. (2015). Aging alters long-term potentiation–related gene networks and impairs synaptic protein synthesis in the rat hippocampus. *Neurobiology of aging*, 36(5), 1868-1880.

Sander GR, Krysinska H, Powell BC. (2006). Developmental Signaling Networks: The Notch Pathway. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 287.

Schwanbeck R. (2015). The role of epigenetic mechanisms in Notch signaling during development. *Journal of cellular physiology*, 230(5), 969-981.

Schweisguth F. (2004). Regulation of Notch Signaling Activity. *Current Biology*, 14: 129–138

Sloan SA, Barres BA. (2014). Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Current opinion in neurobiology*, 27, 75-81.

Sweatt D. (Ed.). (2003). Mechanisms of memory. San Diego:Elsevier Academic Press.

Székely AD. (1999). The avian hippocampal formation: subdivisions and connectivity. *Behavioural brain research*, 98(2):219-225.

Tan SL, Ohtsuka T, González A, Kageyama R. (2012). MicroRNA9 regulates neural stem cell differentiation by controlling Hes1 expression dynamics in the developing brain. *Genes to cells*, 17(12), 952-961.

Tien AC, Rajan A, Bellen HJ. (2009). A Notch updated. *The Journal of cell biology*, 184(5), 621-629.

Tommasi L, Gagliardo A, Andrew RJ, Vallortigara G. (2003). Separate processing mechanisms for encoding of geometric and landmark information in the avian hippocampus. *European Journal of Neuroscience*, 17:1695–1702.

Vasiliauskas, D., Laufer, E., & Stern, C. D. (2003). A role for hairy1 in regulating chick limb bud growth. *Developmental biology*, 262(1), 94-106.

Wang Y, Chan SL, Miele L, Yao PJ, Mackes J, Ingram DK, Mattson MP, Furukawa, K. (2004). Involvement of Notch signaling in hippocampal synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9458-9462.

Wharton KA, Johansen KM, Xu T, Artavanis-Tsakonas S. (1985). Nucleotide sequence from the neurogenic locus Notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. *Cell* 43, 567–581.

Wood ER, Dudchenko PA, Robitsek RJ, Eichenbaum H. (2000). Hippocampal neurons encode information about different types of memory episodes occurring in the same location. *Neuron*, 27(3): 623-633.

Yochem J, Greenwald I. (1989). *glp-1* and *lin-12*, genes implicated in distinct cell-cell interactions in *C. elegans*, encode similar transmembrane proteins. *Cell* 58, 553–563.

Yoon K, Gaiano N. (2005). Notch signaling in the mammalian central nervous system: insights from mouse mutants. *Nature neuroscience*, 8(6), 709-715.

Zhang P, He Q, Chen D, Liu W, Wang L, Zhang C, Ma D, Li W, Liu B, Liu, F. (2015b). G protein-coupled receptor 183 facilitates endothelial-to-hematopoietic transition via *hes1* inhibition. *Cell research*, 25(10), 1093-1107.

Zhang Z, Gao F, Kang X, Li J, Zhang L, Dong W, Jin Z, Li F, Gao N, Cai X, Yang S, Zhang J, Ren X, Yang S. (2015a). Exploring the potential relationship between Notch pathway genes expression and their promoter methylation in mice hippocampal neurogenesis. *Brain research bulletin*, 113, 8-16.

Zhuang J, We Q, Lin Z, Zhou C. (2015). Effects of ADAM10 deletion on Notch-1 signaling pathway and neuronal maintenance in adult mouse brain. *Gene*, 555(2), 150-158.